



Année 2014

Numéro d'ordre : 280-2014

THÈSE
UNIVERSITÉ LYON 1 - CLAUDE BERNARD
ÉCOLE DOCTORALE BMIC

Pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 8 Décembre 2014

par

Laetitia DELABAERE

TITRE :

**Réplication, condensation et division des chromosomes parentaux
dans le zygote de drosophile**

Directeur de thèse : Dr. Benjamin LOPPIN

Membres du jury :

Pr. Cristina VIEIRA (Présidente du jury)

Dr. Martine SIMONELIG (Rapporteur)

Pr. Sophie ROUSSEAU (Rapporteur)

Dr. Maria-Elena TORRES-PADILLA

Dr. Pierre COUBLE

Dr. Benjamin LOPPIN

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements:

Je souhaiterais tout d'abord remercier sincèrement l'ensemble du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci aux Pr. Cristina Vieira, Dr. Martine Simonelig, Pr. Sophie Rousseaux, Dr. Maria-Elena Torres-Padilla, Dr. Pierre Couble et Dr. Benjamin Loppin pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit.

Je voudrais également remercier Benjamin Loppin, mon directeur de thèse, qui m'a énormément soutenu pour que je puisse faire cette thèse, qui m'a permis de travailler sur ce super projet qu'est MH. Merci de m'avoir appris à être plus rigoureuse, plus précise, plus organisée tout en me laissant tenter les expériences que je voulais entreprendre. Je ressors de cette thèse grandie et prête pour de nouvelles aventures de recherche et c'est aussi grâce à toi.

Merci à Pierre Couble, le rayon de soleil des réunions qui me stressaient tant. Ta main sur l'épaule en partant était toujours d'un grand réconfort. Merci d'avoir été si enthousiaste par rapport à mon projet et aussi d'avoir été là quand j'en ai eu besoin.

Je souhaitais également remercier tous les membres de l'équipe pour tout ce que vous m'avez apporté.

Béatrice, merci pour tes conseils avisés, pour les bavardages le matin et pour m'avoir permise d'encadrer deux années de suite ce super TP de génétique sur K81, qui m'a donné le goût à l'enseignement.

Raphaëlle, merci pour toutes ces longues discussions que l'on a pu avoir sur tant de sujets, pour le partage de ton expérience, pour les corrections que tu as pu me faire, pour ton soutien, pour ta bonne humeur et les chansons que tu as pu me mettre dans la tête !

Shuhei, merci pour avoir amené une autre culture dans l'équipe, pour ta politesse exacerbée, ton sourire et pour m'avoir permise de plus pratiquer l'anglais.

Laure, merci de tout ce que tu fais pour que le labo fonctionne bien, pour les fous rires, pour ton amitié. Un grand merci pour avoir été là tout simplement, au long de cette thèse.

Samantha, ça a été un grand plaisir de faire avec toi nos obligations « mouchales », qui sont malgré tout, devenues un moment très sympathique grâce à toi. Merci pour les échanges que nous avons pu avoir sur nos travaux respectifs, sur la cuisine et sur tout le reste. Merci également pour ton amitié, je te souhaite de finir ta thèse avec succès et bonheur.

Je souhaite aussi remercier Claudine pour avoir été une super stagiaire et pour m'avoir permise d'avancer sur le projet ORC2, ainsi que tous les autres stagiaires qui ont pu passer dans l'équipe, pour le souffle nouveau qu'ils ont pu apporter.

Je n'oublierai pas non plus de remercier toutes ces mouches, pour avoir bien voulu pondre et pour toutes celles que j'ai cruellement sacrifiées...mais pour la bonne cause !

Je voudrais remercier les autres membres du CGphiMC avec qui j'ai pu lier des amitiés.

Notamment, Gérard pour ta machine à café et ton bureau accueillant, pour ton soutien et pour être passé me voir quand j'étais toute seule le soir.

Merci à Elsa, aussi pour ta machine à café, mais surtout pour ton soutien, pour le partage de ton expérience, pour tes conseils et pour l'amitié que nous avons pu créer.

Merci à Julien et à Amélie pour m'avoir tenu compagnie le soir dans ce couloir si austère, et pour tout ceux qui ont pu être là dans ces moments là.

Un grand merci également à la Gym Suédoise et toute son équipe sans qui je n'aurais pas tenu le coup ! Ce moment de défoulement, et de bonne humeur hors du labo, m'ont permis de vivre ma thèse plus sereinement.

Merci à Mélanie, Emily, Guillaume et Alice pour avoir partagé ce dure moment qu'est la thèse et pour se serer les coudes !

Enfin, en dehors de ma vie à Lyon, je souhaite remercier Raph qui, bien que ne connaissant pas le monde de la recherche, a toujours été d'un soutien sans faille.

Un immense merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu, qui ont cru en moi et sans qui cette thèse n'aurait jamais été possible. Merci également à mon frère et ma sœur pour tout ce que vous m'apportez.

Je voudrais finalement remercier celui qui m'a tant manqué pendant toutes ces années et qui est maintenant devenu mon mari, Nicolas. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir laissé si longuement te parler de mon travail et un grand merci pour tout l'amour que tu me donnes et qui me permet d'avoir la force de continuer.

Réplication, condensation et division des chromosomes parentaux dans le zygote de drosophile

Table des matières

REMERCIEMENTS:	4
ABREVIATIONS :	9
RESUME	10
SUMMARY	12
AVANT-PROPOS	14
INTRODUCTION	17
I. LES CONTRAINTES DE LA DIVISION DES CHROMOSOMES	18
<i>I.1. Organisation de l'ADN en nucléosome</i>	<i>18</i>
<i>I.2. La Réplication de l'ADN</i>	<i>19</i>
I.2.a. L'initiation de la réplication	19
I.2.b. La réplication des deux brins d'ADN	23
I.2.c. Les ennemis de la fourche de réplication	25
I.2.d. Répliquer coûte que coûte ou mourir ?	28
<i>I.3. La Mitose</i>	<i>34</i>
I.3.a. La condensation des chromosomes	34
I.3.b. L'appariement des chromatides sœurs	35
I.3.c. La ségrégation des chromosomes	36
II. LA DIVISION ZYGOTIQUE	38
<i>II.1. Les gamètes : Deux noyaux haploïdes bien distincts</i>	<i>38</i>
II.1.a. Le noyau du spermatozoïde : Une conformation chromatinienne unique	39
II.1.b. Les mécanismes de condensation de la chromatine du sperme	40
II.1.c. Rôles supposés de la compaction extrême du noyau du sperme	42
<i>II.2. La fécondation</i>	<i>43</i>
II.2.a. La décondensation du noyau du sperme à la fécondation	46
II.2.b. La maintenance de l'intégrité du génome paternel	48
II.2.c. La transmission des territoires chromosomiques	50
RESULTATS ET DISCUSSIONS	53
I. L'ORTHOLOGUE DE SPARTAN, MATERNAL HAPLOID EST ESSENTIEL A L'INTEGRITE DES CHROMOSOMES PATERNELS DANS LE ZYGOTE DE DROSOPHILE	54
<i>I.1. Historique du mutant maternal haploid</i>	<i>54</i>
<i>I.2. Article : The Spartan Ortholog Maternal Haploid is Required for Paternal Chromosome Integrity in the Drosophila Zygote</i>	<i>57</i>
I.3. LA PLUPART DES ACTEURS IMPLIQUES DANS LA FORMATION DU PRONOUYAU MALE NE SONT PAS AFFECTES DANS LES ŒUFS MH	77
I.3.a. Les territoires chromosomiques paternels	77
I.3.b. L'assemblage des fuseaux mitotiques	78
I.3.c. La synchronisation des deux pronoyaux au premier cycle zygotique	80
I.3.d. Les protéines chromatiniennes du sperme	82
I.3.e. La topologie de l'ADN paternel	84
I.3.f. Les lésions d'ADN liées à l'unique conformation de la chromatine paternelle	86
<i>I.4. Discussion autour du rôle de MH dans la formation du zygote et de la maintenance de l'intégrité du génome paternel</i>	<i>89</i>

I.4.a. La réplication de l'ADN paternel.....	89
I.4.b. Les lésions d'ADN.....	90
II. COMMENT CONDENSER LES CHROMOSOMES PARENTAUX AU PREMIER CYCLE ZYGOTIQUE?	96
<i>II.1. Rôle de Cap-D2, un composant du complexe Condensine I, à la fécondation.....</i>	<i>97</i>
<i>II.2. La sous-unité 2 du complexe ORC est dispensable pour la ségrégation des chromosomes</i> <i>paternels.....</i>	<i>101</i>
II.2.a. Contexte de l'étude.....	101
II.2.b. Résultats	102
II.2.c. Discussion :	111
CONCLUSION (PARTIE II)	115
CONCLUSION GENERALE	116
MATERIELS ET MÉTHODES	119
REFERENCES.....	122
ANNEXES.....	143

ABBREVIATIONS :

ORC : Origin Recognition Complex
Pre-RC : Pre-Replication Complex
MCM : Mini Chromosome Maintenance
RPA : Replicative Protein A
PCNA : Proliferative Cell Nuclear Antigen
PRR : Post-Replication Repair
DDT : DNA Damage Tolerance
TLS : Translesion synthesis
SMC : Structural Maintenance of Chromosome
SAC : Spindle Assembly Checkpoint
ICL : Interstrand CrossLink
CPD : Cyclobutane Pyrimidine Dimer
NHEJ : Non-Homologous End Joining
BER : Base Excision Repair
NER : Nucleotide Excision Repair
SNBP : Sperm Nuclear Basic Protein
ROS : Reactive Oxygen Species
MH : Maternal Haploid
CI : Cytoplasmic Incompatibility
shRNA : small hairpin RNA

Mots clefs :

Fécondation, zygote, réplication, intégrité de l'ADN, condensation des chromosomes, pont de chromatine, Maternal Haploid, Cap-D2, ORC2

Key words :

Fertilization, zygote, replication, DNA integrity, chromosome condensation, chromatin bridge, Maternal Haploid, Cap-D2, ORC2

RESUME

Chez les animaux, la reproduction sexuée nécessite la rencontre entre deux gamètes parentaux bien différents : le spermatozoïde et l'ovule. La conformation unique du noyau du spermatozoïde dont la chromatine est organisée avec des protéines chromosomiques spécifiques telles que les protamines le rend totalement inactif. Le remodelage de la chromatine paternelle et le maintien de son intégrité à la fécondation par des activités d'origine maternelle sont donc des processus essentiels à la formation d'un embryon diploïde. Cependant, bien que cruciaux, leurs mécanismes restent encore très mal connus.

Lors de ma thèse j'ai essayé de mieux comprendre les processus qui entrent en jeu pendant l'assemblage *de novo* de la chromatine paternelle chez la drosophile par l'étude d'un mutant léthal embryonnaire à effet maternel : *maternal haploid (mh)*. Ce mutant affecte l'incorporation des chromosomes paternels à la première division zygotique menant à la formation d'embryons haploïdes gynogénétiques.

L'identification du gène de *mh* comme étant *CG9203*, ainsi que la génération d'un allèle nul, *mh*², m'ont permis de caractériser sa fonction. Dans les œufs pondus par les femelles mutantes pour *mh*, les chromosomes paternels se condensent anormalement et ne parviennent pas à se diviser, formant un pont de chromatine à la première division de l'embryon. Récemment, plusieurs études sur son orthologue humain, appelé Spartan/DVC1, ont montré qu'il était impliqué dans la synthèse translésionnelle (TLS), un mécanisme de tolérance aux dommages d'ADN, qui assure la progression de la fourche de réplication. Par des approches génétiques et cytologiques, j'ai pu démontrer que dans les cellules somatiques, la fonction de Spartan dans le TLS est conservée chez la drosophile. Cependant, j'ai observé que la fonction critique de MH pendant la formation du zygote ne relevait pas du TLS canonique, mais qu'elle permettait de maintenir l'intégrité de l'ADN paternel, pour lui permettre de se répliquer normalement pendant le premier cycle.

La caractérisation du phénotype de *mh* m'a conduit à le comparer à des phénotypes induits par la déplétion de facteurs impliqués dans la réplication et notamment, dans la condensation des chromosomes parentaux dans le zygote. De façon surprenante, une des protéines qui permettent la mise en place des complexes de pré-réplication n'est pas requise pour la ségrégation des chromosomes paternels, contrairement à ceux d'origine maternelle.

Ensemble, ces travaux soulignent la différence qu'il existe entre les deux noyaux parentaux et la complexité que présente le maintien de leur intégrité à la fécondation.

SUMMARY

In animals, sexual reproduction requires the union between two distinct parental gametes: the spermatozoon and the oocyte. The unique nuclear conformation of the sperm, in which the chromatin is organized with sperm-specific chromosomal protein like protamines, abolishes its activity. The paternal chromatin remodeling and the maintenance of its integrity at fertilization by maternal activities are therefore essential processes for zygote formation. However, although their mechanisms are crucial, they remain poorly understood.

During my thesis, I tried to better understand the processes involved during *de novo* paternal chromatin assembly in *Drosophila* through the study of a maternal embryonic lethal mutation: *maternal haploid* (*mh*). The mutant affects the incorporation of paternal chromosomes during the first zygotic division, leading to the development of gynogenetic haploid embryos.

The identification of the *mh* gene as *CG9203*, and the generation of the null allele *mh*² allowed me to characterize its function. In eggs led by *mh* mutant females, paternal chromosomes abnormally condense and fail to divide leading to the formation of chromatin bridges at the first embryonic division. Recently, its human ortholog Spartan/DVC1, has been described to be involved in translesion synthesis (TLS), a DNA damage tolerance pathway that ensures replication fork progression. Combining genetic and cytological approaches, I demonstrated that the Spartan function in TLS is conserved in *Drosophila*. However, I discovered that the critical function of MH during the first embryonic division, was not consistent with a canonical TLS. Alternatively, it is specifically required to maintain paternal DNA integrity and to allow its proper replication at the first cycle.

The *mh* phenotype characterization, led me to compare it with others phenotypes induced by the knock-down of replication factors and to study parental chromosome condensation in the zygote. Surprisingly, one of the proteins allowing the establishment of the pre-replication complex is dispensable for the proper paternal chromosome segregation contrarily to the maternal counterpart.

Altogether, these works highlight the difference that exists between the two parental pronuclei and the complexity of maintaining their integrity at fertilization.

AVANT-PROPOS

La molécule d'ADN, présente dans toutes les cellules vivantes, est le support de l'information génétique nécessaire à la vie. Chez les animaux, la transmission d'une génération à l'autre de ce matériel, est notamment permise grâce à la reproduction sexuée. Celle-ci permet aux espèces de se perpétuer, de brasser leurs gènes et représente un des éléments clefs dans le processus d'évolution des espèces.

La reproduction sexuée, débute avec la rencontre du spermatozoïde et de l'ovule, deux cellules singulières bien différentes, formées grâce à la division méiotique. Au cours de la formation des gamètes, la division de moitié de leur matériel génétique, le large remodelage de la chromatine et la forte spécialisation de ces cellules leur confèrent leur aptitude à la fécondation et à la formation du zygote. En particulier, le spermatozoïde acquiert une conformation de la chromatine différente de toutes les autres cellules, où les histones sont remplacées par des protéines basiques, uniquement retrouvées dans ce noyau, qui vont très souvent le condenser fortement. L'intégration des chromosomes paternels dans le zygote représente donc un défi majeur pour les protéines présente dans l'ovocyte. Cette étape implique un changement considérable dans la conformation de cette chromatine qui est indispensable à la première division de l'embryon diploïde. Pourtant, bien qu'essentiels, les processus qui entrent en jeux sont encore très mal connus.

Afin de mieux comprendre comment les chromosomes paternels peuvent se former et s'intégrer dans le zygote, l'équipe d'accueil dans laquelle j'ai effectué ma thèse, étudie des mutations rares à effet parental qui affectent spécifiquement cette étape et qui mènent à la formation d'embryons haploïdes gynogénétiques chez *Drosophila melanogaster*. Ce modèle est particulièrement adapté à l'étude des mécanismes impliqués dans la formation du zygote. Le fait que cette espèce pondre des œufs presque immédiatement après la fécondation, permet, grâce à leur récolte, de pouvoir observer les premières étapes de la formation d'un embryon sans altérer les conditions physiologiques dans lesquelles s'effectuent ces processus. Au delà de ces avantages, sa facilité d'élevage et son utilisation dans la recherche depuis une centaine d'année, ont permis de développer une quantité de formidables outils génétiques, faisant de la drosophile un modèle de choix dans l'étude des mécanismes développementaux et physiologiques, tant aux niveau moléculaire qu'au niveau cellulaire.

Afin de progresser dans la compréhension des processus qui interviennent lors de l'intégration des chromosomes paternels dans le zygote, j'ai caractérisé la fonction de la protéine Maternal Haploid (MH), dont le mutant a été isolé il y a maintenant presque 40 ans.

La majeure partie de cette thèse y est d'ailleurs consacrée. *mh* est une mutation embryonnaire létale à effet maternel. Les femelles *mh* pondent des œufs qui ne parviennent jamais à éclore, à cause de la perte des chromosomes paternels à la formation du zygote. La protéine est conservée chez les animaux, et alors que rien n'était connu sur ses homologues, au cours de ma thèse, un grand nombre d'études ont été publiées en très peu de temps sur la fonction de son orthologue humain, Spartan/DVC1, dans des cellules en culture. Ce formidable engouement dans la recherche de la fonction de cette protéine, a montré l'importance de décrypter ses mécanismes d'action. Par ailleurs, ces études m'ont aussi amené à étudier son rôle au niveau somatique bien que non essentiel, contrairement à celui qu'elle joue dans la formation du pronoyau mâle.

La caractérisation de la fonction de MH m'a également permis d'explorer une multitude de processus impliqués dans la division des chromosomes en général. Ceci m'a d'ailleurs amené à découvrir un phénotype très intéressant induit par la déplétion d'une protéine (ORC2), décrite comme étant indispensable à la formation des complexes de pré-réplication, en autorisant et en régulant l'initiation de la duplication de l'ADN. Son étude préliminaire est également présentée dans cette thèse.

Dans cette introduction, j'exposerai donc les mécanismes principaux qui permettent une division sans encombre des chromosomes au sens large, dans les cellules somatiques, majoritairement conservés parmi les espèces. Ensuite, je me focaliserai plus particulièrement sur le remodelage de la chromatine du spermatozoïde pendant la spermiogénèse, et sur les contraintes de la fécondation et de la première mitose zygotique chez divers animaux. Bien que cette première partie ne soit pas exhaustive, elle permet, à mon sens, de comprendre les problématiques abordées dans cette thèse. Malgré les embûches qui se sont parfois dressées sur l'avancée de ces travaux, les questions qui se sont posées n'ont pas cessé de me passionner. J'espère, au travers de cet exposé pouvoir transmettre l'intérêt que j'ai pu avoir sur ces processus si fondamentaux.

INTRODUCTION

I. Les contraintes de la division des chromosomes

La capacité de division de la cellule est à la base de la vie sur terre. Ce processus si fondamental implique pourtant une multitude d'acteurs. Ceux-ci sont en général bien conservés et doivent être finement régulés. Pour se diviser, l'ADN doit pouvoir se répliquer, se réparer, se condenser pour former des chromosomes, pour qu'enfin ils se ségrègent de façon équivalente entre les deux cellules filles. Pour tous ces processus, chez presque tous les eucaryotes, l'ADN doit être d'abord compacté avec des protéines appelées histones, en formant des nucléosomes.

1.1. Organisation de l'ADN en nucléosome

Dans toutes les cellules, l'ADN n'est pas nu. Dans la très grande majorité des cas, son premier niveau de compaction se fait avec des histones pour former des nucléosomes, ce qui donne la fibre de chromatine de 10 nm. Un nucléosome est défini par l'association d'un fragment d'ADN de 146 nucléotides enroulé autour d'un octamère d'histones composé de quatre histones de cœur : H2A, H2B, H3 et H4. Ils sont reliés entre eux par des connecteurs comme l'histone H1.

Le rôle de l'assemblage de l'ADN en nucléosomes n'est pas seulement de stocker l'information génétique. Il permet également d'obtenir divers moyens de réguler les processus cellulaires tels que l'expression ou la répression des gènes, la réplication, ou la réparation de l'ADN, la compartimentation de l'euchromatine et de l'hétérochromatine, ou encore l'identification de certains territoires chromosomiques.

Les histones canoniques sont bien conservées parmi les espèces et leur incorporation dans la chromatine est couplée à la réplication. Il existe également une multitude de variants qui se sont bien souvent spécialisés dans certaines fonctions et peuvent être incorporés en dehors de la phase S. Par exemple, la présence du variant de l'histone H3, H3.3, est bien souvent associé à des régions actives au niveau de la transcription (Chen *et al*, 2013; Schwartz & Ahmad, 2005; Ahmad & Henikoff, 2002). Le variant d'histone CenH3 (*Centromeric H3*), encore appelé CENPA chez les mammifères ou Cid chez la drosophile, est

lui, uniquement retrouvé au niveau des centromères, et leur confère généralement leur identité (Padeganeh *et al*, 2013).

Toutes les histones peuvent être modifiées post-traductionnellement. Elles peuvent être acétylées, méthylées, phosphorylées, ubiquitinées ou sumoylées. Toutes ces modifications vont changer leur affinité à l'ADN et/ou permettre le recrutement d'autres protéines. A titre d'exemple, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me) est en règle générale retrouvée dans l'hétérochromatine. Elle permet le recrutement de la protéine HP1 (Heterochromatin protein 1), laquelle éteindra l'expression des gènes ou des éléments transposables qui s'y trouvent (Sims *et al*, 2003; Lachner *et al*, 2001). Une autre modification bien connue est la phosphorylation du variant d'histone H2A.X (H2A.X chez les mammifères, H2A.Z chez la drosophile, H2A chez la levure (Talbert *et al*, 2012)) est quant à elle retrouvée au niveau des lésions d'ADN. Elle permettrait par exemple, de décondenser la chromatine afin de faciliter l'accessibilité des acteurs de la réparation au niveau de l'ADN (Madigan *et al*, 2002; Paull *et al*, 2000; Iacovoni *et al*, 2010; Stucki & Jackson, 2006; Celeste *et al*, 2003; Hamer, 2002; Downs *et al*, 2000).

La conformation de l'ADN par ces protéines ainsi que leurs modifications, rend la régulation des processus cellulaires extrêmement complexe. Ne constituant pas l'objet principal de ma thèse, j'ai décidé de ne pas les détailler ici. Néanmoins, l'organisation de la chromatine en nucléosomes est, en règle générale, indispensable à la vie et doit donc être finement régulée pour permettre, entre autres, la division des chromosomes. Pour se faire, l'ADN doit tout d'abord se répliquer.

1.2. La Réplication de l'ADN

1.2.a. L'initiation de la réplication

La réplication du matériel génétique est la première étape cruciale de la division de la cellule. Elle doit être menée à bien pour pouvoir transmettre un génome intègre et complet à chacune des deux cellules filles qui découleront de cette division. Dans ce but, cette étape débute par la préparation de la réplication, à la fin de la mitose et en phase G1, qui consiste en

la reconnaissance des origines de réplication et à la mise en place des complexes de pré-RC (*pre-Replication Complex*).

Le complexe de pré-RC est défini comme l'association du complexe ORC, jouant un rôle primordial dans sa formation, avec Cdc6, Cdt1 et le complexe d'hélicases Mcm2-7 (*Mini chromosome maintenance 2-7*) (Figure 1) (Sun & Kong, 2010; Speck *et al*, 2005; Diffley *et al*, 1994). Dans un premier temps, le complexe ORC (*Origine Recognition Complex*), composé de 6 sous-unités (ORC1-6), se fixe sur l'origine de réplication pour recruter Cdc6 de manière dépendante de l'ATP (Speck *et al*, 2005). L'activité ATPase du complexe ORC serait supportée par la sous-unité 1 du complexe qui est l'élément majeur pour sa localisation (Machida *et al*, 2005). Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, la sous-unité 4 est requise pour reconnaître spécifiquement les origines de réplication, et ainsi les lier fortement au moyen de ses 9 motifs crochets AT (*AT-hook*) (Kong & DePamphilis, 2001). Chez *Saccharomyces cerevisiae* c'est la sous-unité 2 qui jouerait cette fonction, les crochets AT étant uniquement présents dans cette protéine du complexe ORC (Duncker *et al*, 2009). Récemment, la protéine Sap1 (Girdin chez l'Homme), qui interagirait avec le complexe ORC ainsi qu'avec l'ADN, a été suspectée pour être impliquée dans la formation du complexe de pré-RC (Wu *et al*, 2014; Sun & Kong, 2010). Le complexe ORC et certainement la protéine Sap1, en plus de Cdc6, permettent de recruter Cdt1 qui est indispensable au recrutement des hexamères d'hélicases Mcm2-7. Ces derniers permettent de débobiner l'ADN pour démarrer la réplication (Figure 1).

Une fois ce complexe de pré-RC formé, la réplication n'est initiée qu'une fois les hélicases activées, certainement par des kinases dépendantes de la cycline (CDK) (Maiorano *et al*, 2006; Nishitani & Lygerou, 2002). Il faut noter que la protéine Cdt1 doit être dégradée par son ubiquitination, une fois les origines activées, pour prévenir d'une éventuelle re-réplication (Kim & Kipreos, 2007). La régulation de l'activité de cette protéine est permise grâce à la protéine Geminin (Hall *et al*, 2008; Quinn *et al*, 2001) (Figure 1).

Non seulement les hélicases permettent le démarrage de la réplication au niveau de ses origines, mais elles sont ensuite requises pendant tout le processus de synthèse d'ADN de façon indépendante du complexe de pré-RC. Ce processus induit la formation de deux simple-brins, qui seront protégés temporairement par le complexe hétérotrimérique RPA (*Replication Protein A*) (Figure 1) se liant spécifiquement à ceux-ci (Alani *et al*, 1992). Il leur évitera de

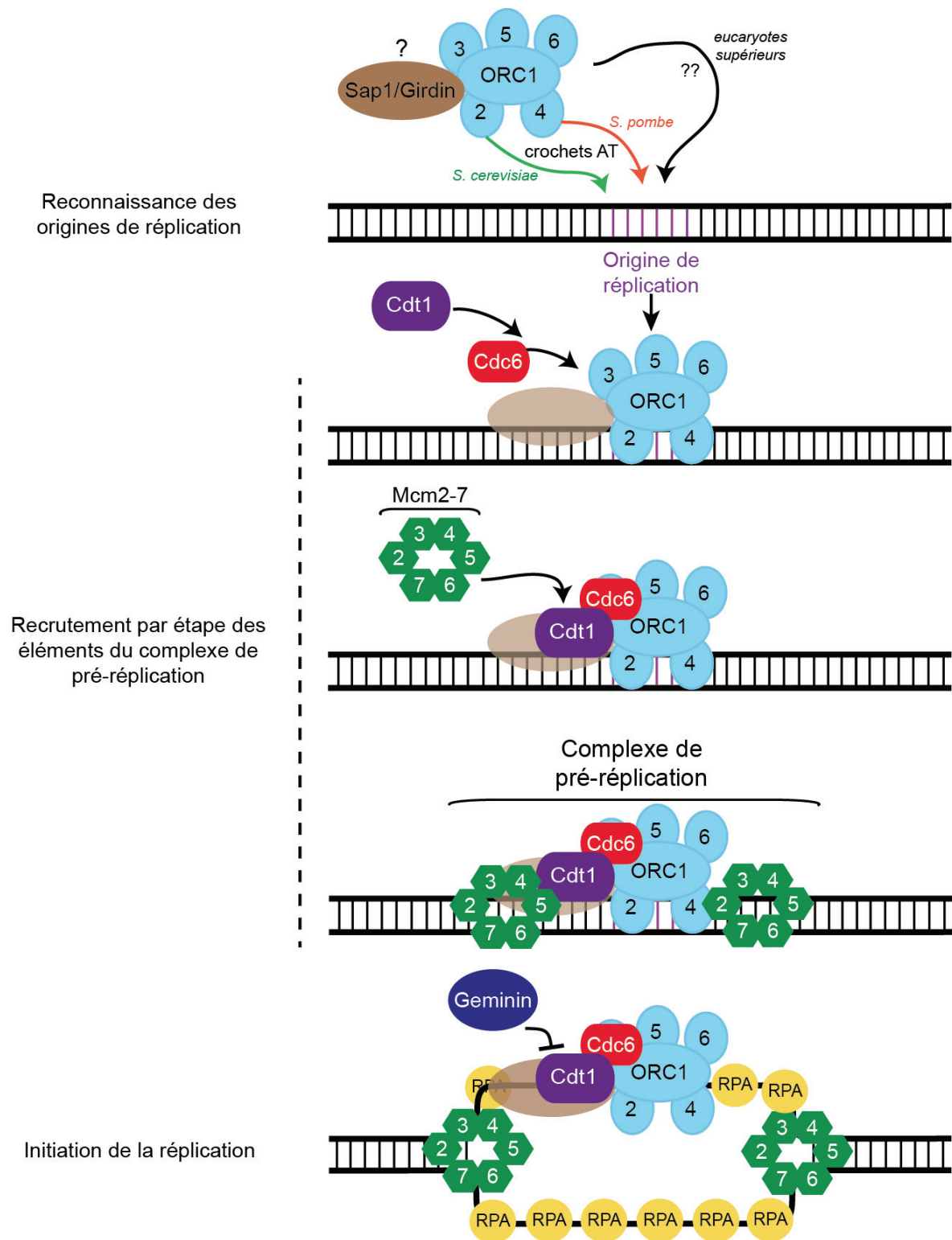


Figure 1: Mise en place du complexe de pré-RC et activation des origines

La mise en place du complexe de pré-RC se fait tout d'abord avec le recrutement du complexe ORC (ORC1-6), au niveau des origines de réplication, certainement avec la protéine Sap1/Girdin. Chez *S. pombe*, la reconnaissance des origines se fait grâce à ORC4 et ses crochets AT. Chez *S. cerevisiae*, c'est ORC2 qui a cette fonction. Le complexe ORC recrute ensuite Cdc6, Cdt1 puis le complexe d'hélicase Mcm2-7 qui permet de débobiner l'ADN, une fois activé. Les simples brins d'ADN ainsi formés sont protégés par le complexe RPA. Une fois l'origine de réplication activée, Geminin inhibe Cdt1 pour empêcher une re-réplication.

former des structures secondaires qui seraient délétères pour la progression de la fourche de réplication.

Chez les procaryotes, une seule origine de réplication est présente, rendant la durée de cette étape proportionnelle à la longueur du génome. Cependant, chez les eucaryotes, des origines de réplication se répartissent sur toute la longueur du génome. En effet, chez l'Homme par exemple, la fourche de réplication est 20 fois plus lente que chez *Escherichia coli* et son génome est 700 fois plus grand. S'il n'y avait qu'une seule origine de réplication, cela prendrait 20 jours au minimum pour qu'une cellule se divise (Méchali, 2010). La problématique ici, est d'avoir suffisamment d'origines de réplication pour que le génome soit entièrement répliqué pendant la durée de la phase S, mais qu'elles ne soient pas trop nombreuses, évitant ainsi la re-réplication de certaines régions ou bien l'amplification de gènes avant la division des chromosomes. Ceci serait délétère pour la cellule, l'empêchant de se diviser correctement. Chez la levure, des études ont montré que les origines de réplication sont déterminées de façon spécifiques de la séquence par des éléments présents dans le génome : les ARS (*Autonomously Replicating Sequences*) (Stinchcomb *et al*, 1979; Beach *et al*, 1980). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, ces éléments sont plutôt bien définis par des consensus d'environ 11pb appelés « éléments A » (Newlon & Theis, 1993). Chez *Schizosaccharomyces pombe*, ces éléments sont bien plus grands, sans vrai consensus défini, mais sont riches en A/T (Okuno *et al*, 1999; Maundrell *et al*, 1988). *S. cerevisiae* et *S. pombe*, contiennent environ le même nombre d'éléments (Cvetič & Walter, 2005), ce qui est cohérent avec la taille similaire de leur génome, ainsi qu'avec la durée respective de leur phase S. Chez les métazoaires cependant, hormis quelques cas particuliers comme les gènes de la β globin chez les mammifères (Wang *et al*, 2006) ou ceux de chorion chez la drosophile (Zhang & Tower, 2004), l'identité des origines de réplication n'est pas définie par une séquence (Schepers & Papior, 2010; Vashee *et al*, 2003). Leur nombre est variable selon les espèces, le type de cellule, et change tout au long du développement. C'est le cas par exemple chez la drosophile ou le xénope, où pendant les premiers cycles de développement, les phases S étant extrêmement rapides, les origines de réplication activées sont bien plus nombreuses que par la suite (Cvetič & Walter, 2005). Le mécanisme par lequel ces origines sont définies reste encore mal compris. Il semblerait toutefois que l'état dans lequel se trouve la chromatine joue un rôle non négligeable dans cette détermination. Il a en effet été démontré que le complexe ORC serait chargé sur une chromatine ouverte et des zones dépourvues en nucléosome (Eaton *et al*, 2011; Roy *et al*, 2010). De plus, il se localiserait dans des régions

transcriptionnellement actives, riches en variants d'histone H3.3 (Eaton *et al*, 2010), mais serait cependant totalement absent des régions hétérochromatiques, qui sont d'ailleurs répliquées tardivement (Figure 2) (Belyaeva *et al*, 2012).

En plus de la détermination des origines de réplication, les modifications épigénétiques semblent aussi avoir un rôle majeur dans l'autorisation de l'initiation de la réplication. Chez la levure l'acétylation des histones a été associée avec le démarrage de la réplication (Vogelauer *et al*, 2002). Dans les cellules humaines, l'acétylation de l'histone H4 par HBO1 a été décrite comme activant l'initiation de la réplication, par le recrutement de Cdt1 et la formation des complexes de pré-RC (Miotto & Struhl, 2010). De la même façon chez la drosophile, l'hyperacétylation de l'histone H4 a été associée à l'initiation de la réplication au niveau de l'amplification des gènes de chorion (Hartl *et al*, 2007). Par ailleurs, PR-Set7, responsable de la monométhylation de H4K20, serait nécessaire à l'activation des origines de réplication (Tardat *et al*, 2007; Jørgensen *et al*, 2007). Cette modification post-traductionnelle aurait également, un rôle dans le recrutement du complexe ORC (Beck *et al*, 2012). D'un autre côté, la di-méthylation de H3K79, qui se localise au niveau de l'ADN nouvellement répliqué, empêcherait une nouvelle initiation de la réplication (Fu *et al*, 2013).

Finalement, il semblerait qu'un grand nombre d'origines de réplication serait distribué dans le génome, sans pour autant être toutes activées, et que celles qui le sont, ne le sont pas forcément en même temps (Figure 2). Dans certains cas, on considère que les origines de réplication sont réparties à intervalles réguliers sur le génome et qu'elles sont simultanément activées, comme dans les premières étapes du développement chez la drosophile (Spradling & Orr-Weaver, 1987) et le xénope (Hyrien & Méchali, 1993), où les cycles s'enchainent à une très grande allure sans phases G1 ou G2.

1.2.b. La réplication des deux brins d'ADN

La formation de la fourche de réplication bidirectionnelle induit le recrutement des protéines qui permettent la synthèse d'ADN. Une fois que l'ADN est déroulé par les hélicases, et que les simples brins transitoirement formés sont protégés par RPA (Figure 1 et

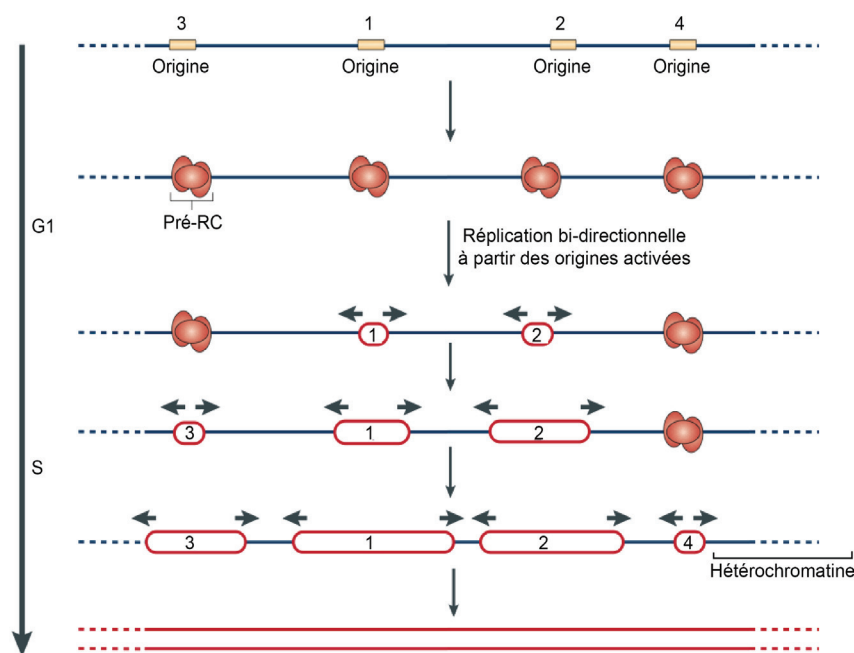


Figure 2: Activation des origines de réplication pendant la phase S

Les origines de réplication, distribuée le long du génome ne sont pas activées en même temps par les complexes de pré-RC, qui se localisent au niveau de l'ADN dès la phase G1. L'hétérochromatine est répliquée tardivement (d'après Méchali, 2010).

3), deux mécanismes existent pour dupliquer chacun des deux brins d'ADN : Le brin précoce (ou *leading strand*) est répliqué continuellement par l'activité polymérase 5'-3' des ADN polymérases. Le brin retardé, quant à lui, ne peut être répliqué que de façon discontinue avec les fragments d'Okasaki, d'environ 100 à 200 nucléotides chez les eucaryotes (Leman & Noguchi, 2013). Dans les deux cas, la synthèse d'ADN débute avec la mise en place d'amorces ARN d'environ 10 nucléotides, puis d'amorces ADN, d'une longueur de 20 à 30 bases, synthétisées par la primase, ADN polymérase α (Leman & Noguchi, 2013; Miyabe *et al*, 2011) (Figure 3). Le complexe RFC (*Replication Factor C*), qui se lie aux amorces ADN nouvellement synthétisées, permet le recrutement du facteur de réplication, le *sliding clamp* PCNA (*Proliferative Cell Nuclear Antigen*), correspondant au complexe β chez *E. coli*. Cet homotrimère en forme d'anneau, encercle l'ADN simple brin en aval des hélicases et recrute les polymérases répliquatives à l'ADN (Figure 3) (Moldovan *et al*, 2007; Paunesku *et al*, 2001). PCNA permet de les maintenir au niveau de l'ADN et améliore leur processivité. Ces polymérases répliquatives sont la polymérase δ pour le brin retardé, et la polymérase ϵ pour le brin avancé (Figure 3) (Miyabe *et al*, 2011).

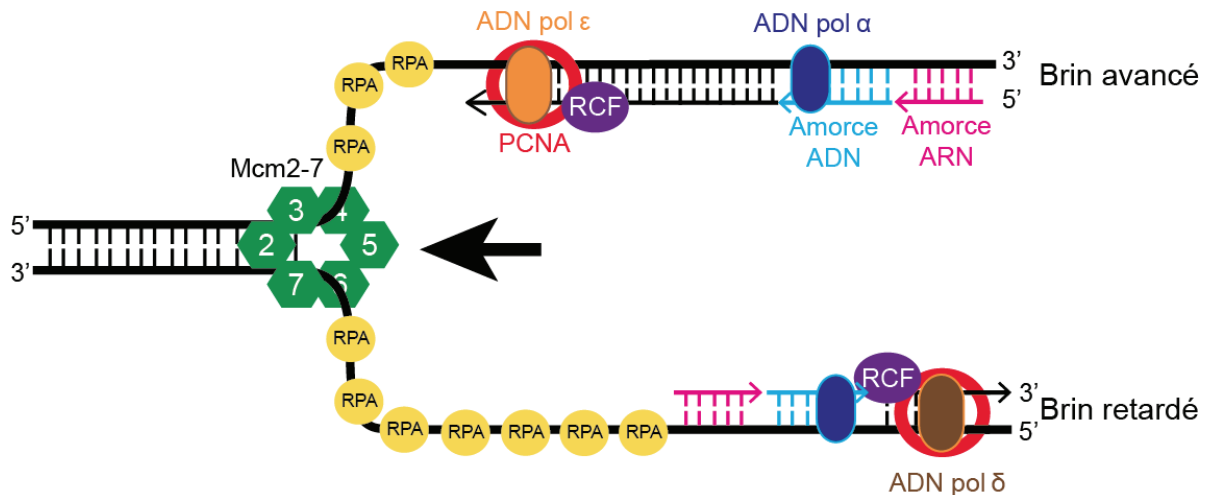


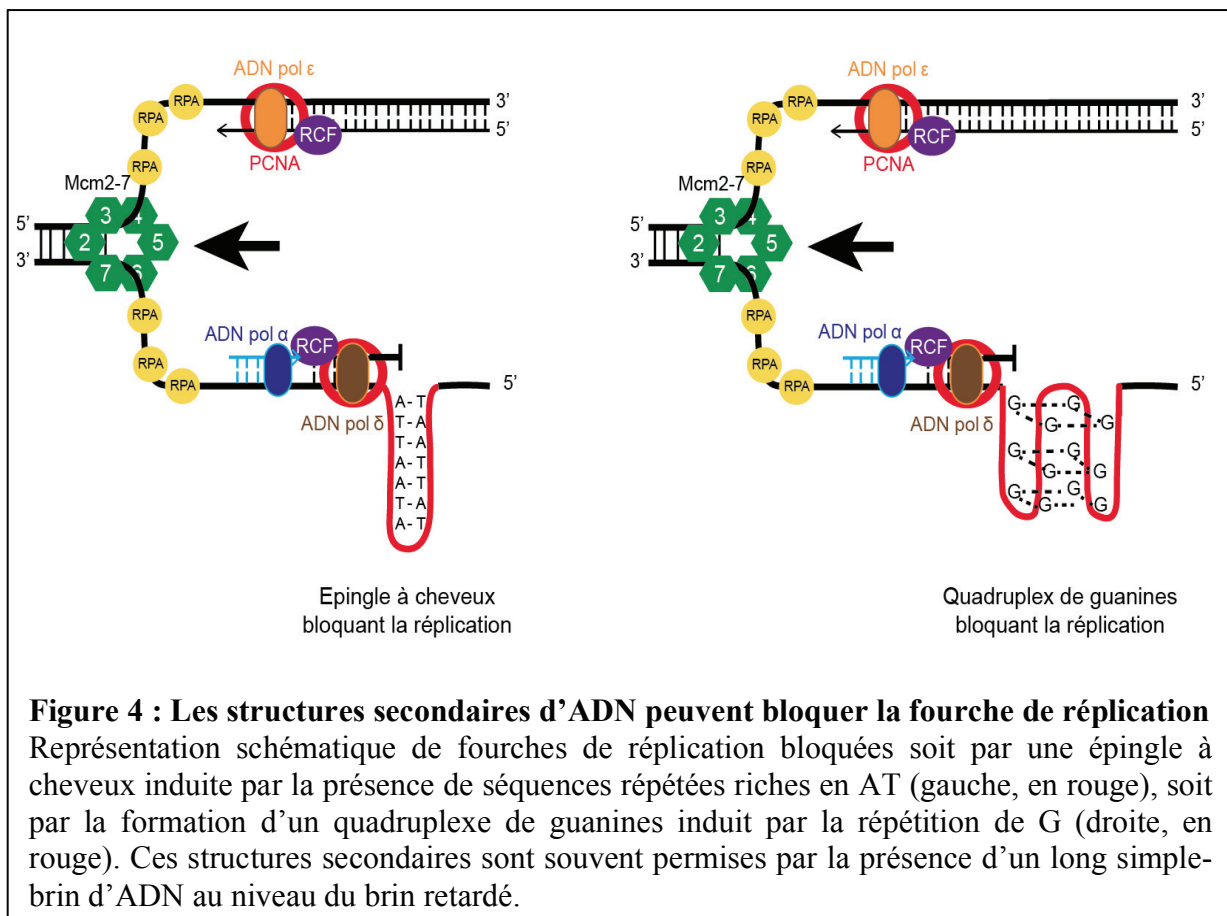
Figure 3 : La fourche de réplication

Représentation schématique d'une fourche de réplication active. Une fois l'origine de réplication activée, la réplication débute avec la mise en place d'amorces ARN sur les deux brins, puis d'amorces ADN synthétisées par la primase ADN polymérase α (ADN pol α). RCF permet de recruter le *sliding clamp* PCNA au niveau de ces amorces. PCNA recrute les polymérases répliquatives et les maintient sur l'ADN pendant sa synthèse (polymérase ϵ (ADN pol ϵ) pour le brin avancé et polymérase δ (ADN pol δ) pour le brin retardé). L'activité polymérase 5'-3' induit deux mécanismes de réplication. L'un est continu (brin avancé) et l'autre forme des fragments d'Okazaki (non montré) (brin retardé). La progression de la fourche est permise entre autres par les hélicases Mcm2-7 qui séparent l'ADN en simples brins protégés transitoirement par le complexe RPA.

1.2.c. Les ennemis de la fourche de réplication

Même si la réplication est correctement initiée et régulée, et que les acteurs de la réplication sont présents en quantité suffisante, la progression de la fourche de réplication peut être compromise par plusieurs facteurs. Premièrement, elle peut être bloquée par des structures secondaires de l'ADN dans des régions répétées riches en AT, plus relâchées, et qui peuvent plus facilement conduire à des structures telles que des cruciformes d'ADN (Lukusa & Fryns, 2008; Zhang & Freudenreich, 2007; Zlotorynski *et al*, 2003). Les régions répétées riches en AT peuvent également former des épingles à cheveux. Ces structures sont vraisemblablement plus impliquées dans le blocage de la fourche de réplication que les

cruciformes d'ADN et se trouvent notamment au niveau du brin retardé, qui induit des simples brins beaucoup plus longs que le brin avancé après le passage des hélicases (Figure 4) (Voineagu *et al*, 2008). Il a été montré que certaines de ces structures secondaires sont résolues avec l'intervention de la topoisomérase II (Froelich-Ammon *et al*, 1994). Les séquences riches en guanine sont aussi sujettes à la formation de structures secondaires qui affectent la progression de la fourche de réplication. Les quadruplexes de guanines (*G-quartet*) correspondent à des guanines successives, formant des liaisons hydrogènes entre elles, donnant naissance à des sortes de feuillets (Figure 4). Ils peuvent survenir lors de la réplication ou de la transcription quand un simple brin d'ADN est formé, comme au niveau du brin retardé (Figure 4) (Edwards *et al*, 2014; Murphy *et al*, 2014; Bétous *et al*, 2009). Cependant, ces structures servent aussi à la stabilisation des télomères et sont induites par la topoisomérase I (Arimondo *et al*, 2000). Leur résolution serait permise par la nucléase GQN1 (*G quartet nuclease 1*) (Sun *et al*, 2001) ou par la topoisomérase II (Chung *et al*, 1992).



Ensuite, La transcription peut également perturber la réplication par la collision des deux fourches si celles-ci sont opposées. Il faut donc pouvoir stopper la fourche de réplication rencontrant une machinerie de transcription pour permettre à la fourche allant dans le même sens que la transcription, de pouvoir compléter la duplication de cette région. Il existe divers moyens pour éviter la collision des deux différentes fourches (Helmrich et al, 2013). Par exemple, au niveau des gènes d'ARNs ribosomiques, la cellule a développé des barrières unidirectionnelles de fourches de réplication consistant en un complexe entre l'ADN et des facteurs de terminaison de la réplication comme la protéine TTF-1 chez la souris (Putter & Grummt, 2002). Ceci empêche au niveau d'un certain point (à la fin d'une unité de transcription), l'avancée de la fourche de réplication allant dans le sens inverse de celle de transcription, et ne permet donc plus que la réplication dans un seul sens.

Finalement, les dommages d'ADN peuvent aussi fortement affecter la progression de la fourche de réplication, entraînant ainsi, soit un arrêt de la progression de l'hélicase et du réplisome, comme ce que peuvent engendrer des pontages inter-brins (*Interstrand Cross-Links* (ICL)) ou des liaisons covalentes entre ADN et protéines, soit stopper uniquement le réplisome, comme avec des altérations de bases, alors que les hélicases continueront à dérouler l'ADN dont les simple-brins seront extensivement exposés à tout type d'agression (Figure 5) (Lambert & Carr, 2005). Il existe en effet plusieurs types d'altération de bases qui pourront bloquer la fourche de réplication. Par exemple, les espèces réactives de l'oxygène ou des agents alkylants tels que le benzo[a]pyrene diol epoxide, peuvent oxyder des guanines (8-oxo-guanine) ou transformer une cytosine en uracile. Ensuite, des facteurs environnementaux comme les UV peuvent également altérer des bases (on les appellera les *photo-products* (les

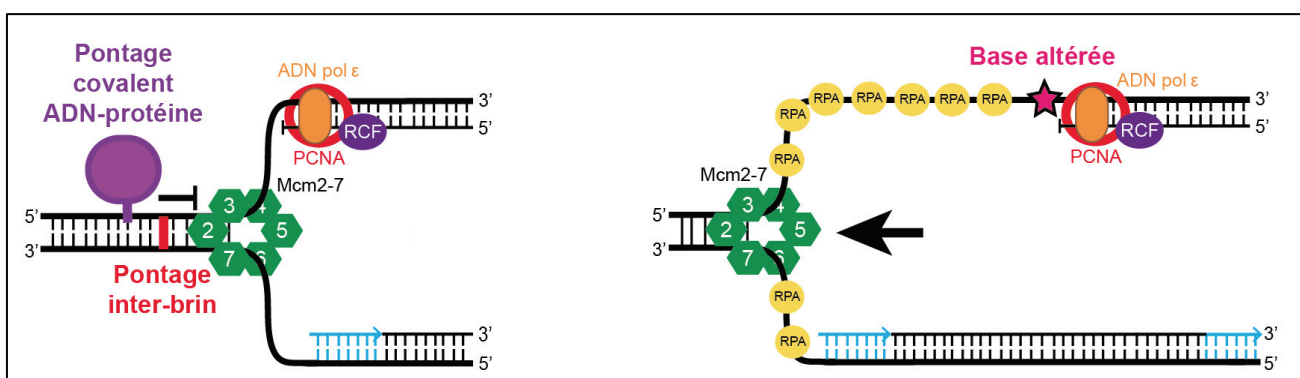


Figure 5: Les lésions d'ADN peuvent bloquer la réplication de différentes manières

Selon le type de lésion, il existe deux types de blocages de la fourche de réplication. Soit les hélicases sont bloquées dans leur progression par des pontages inter-brins ou par des pontages ADN-protéine (gauche), soit c'est le réplisome uniquement par l'altération de bases, alors que les hélicases continuent de dérouler l'ADN (droite).

dimères de pyrimidine cyclobutane (CPD) ou les 6-4 Pyrimidine-Pyrimidones (6-4 PP)). Ces bases altérées seront par la suite impossibles à répliquer pour des polymérases répliquatives.

La progression des polymérases peut être également ralentie voire inhibée, soit lorsque l'activité d'une ADN polymérase est affectée, comme avec l'aphidicoline, qui inhibe l'activité de l'ADN polymerase- α (Krokan *et al*, 1981), soit quand le substrat des polymérases n'est plus en quantité suffisante, comme en présence d'hydroxyurée (HU), qui affecte la synthèse des nucléotides. Dans ce cas, le problème peut parfois être pris en charge en allongeant la durée de la phase S par les *checkpoints* de réplication d'ADN et en empêchant le passage à la phase G2/M. Une des protéines impliquée dans ce contrôle est la kinase ATR, dont les cibles sont par exemple les kinases Chk2 chez la levure, et Chk1 chez les métazoaires (Wu *et al*, 2014).

I.2.d. Répliquer coûte que coûte ou mourir ?

Si une lésion d'ADN est présente pendant la réplication, il est largement préférable de continuer la duplication du génome et de réparer ensuite, plutôt que de prendre le risque de voir la fourche s'effondrer et que des cassures double-brins soient engendrées, empêchant ainsi de compléter la duplication du génome et entraînant bien souvent la mort de la cellule.

Les mécanismes qui entrent en jeu ici, sont la voie de réparation post-réplication (PRR) ou la tolérance aux dommages d'ADN (DDT). Il en existe deux sortes. La plus connue se nomme synthèse translesionnelle (*translesion synthesis* (TLS)). Elle permet d'outrepasser la lésion d'ADN en changeant de polymérase. Les polymérases répliquatives, ou polymérases de la famille B, sont très spécifiques des bases canoniques et ne peuvent pas s'accommoder d'une base altérée. En effet leur site actif est très spécialisé dans la « lecture » des bases de Watson et Cricks, et ne laisse pas la place à une base modifiée. Au niveau d'une lésion d'ADN où la fourche de réplication est bloquée, ces polymérases seront donc remplacées par des polymérases TLS (pour la plupart de la famille Y) qui seront capables de répliquer la ou les base(s) endommagée(s) (Figure 6) (Ghosal & Chen, 2013; Lee & Myung, 2008; Lehmann *et al*, 2007). Ces polymérases ont un site actif plus ouvert et un encombrement stérique moindre, leur permettant de répliquer des bases altérées qui perturbent la conformation de la

double hélice d'ADN. De plus, elles n'ont pas d'activité *proofreading*, ce qui leur permet de répliquer une lésion, malgré leur processivité plus basse que les polymérases répliquatives, en mettant un nucléotide quelconque, sans revenir en arrière (Ling *et al*, 2001; Yang & Woodgate, 2007). Ces mécanismes seront donc à la base d'erreurs plus ou moins importantes dans la réplication selon les types de lésions et les polymérases utilisées.

Les mécanismes qui gouvernent le changement de polymérase sont encore mal connus, mais il semblerait que les polymérases TLS ont une spécificité de substrat différente selon le type de lésion (Yang & Woodgate, 2007). Par exemple, les produits engendrés par une exposition aux UV, comme des dimères de thymine, sont préférentiellement répliqués par la polymérase η , qui ajoutera une guanine en face de la première thymine (3'T). Cependant, la polymérase η ne pourra pas continuer l'élongation de la réplication à partir d'une paire de nucléotides aberrante (ici T-G). C'est alors que la polymérase ζ (Rev3 et 7) pourra prendre le relais pour faire progresser la réplication à partir de ce point (Nelson *et al*, 1996a, 1996b; Johnson *et al*, 2001).

Un autre exemple est l'oxydation des guanines, engendrées par une exposition au benzo[a]pyrene diol epoxide (Yang & Woodgate, 2007). Chez les mammifères, la polymérase κ (polymérase IV chez *E. coli*) est non seulement capable d'outrepasser cette lésion d'ADN en ajoutant le nucléotide adéquat en face (ici une cytosine), mais elle peut également synthétiser l'ADN dans la phase d'extension, une fois que le nucléotide endommagé ait été répliqué. Cependant, elle peut de cette manière, engendrer une délétion d'un nucléotide en fonction de la séquence qui précède la lésion (Zhang *et al*, 2002; Jarosz *et al*, 2006; Neeley *et al*, 2007). Chez la levure, c'est la polymérase ζ qui sert majoritairement au TLS pour outrepasser ce type de lésion (Zhao *et al*, 2006).

Une autre alternative pour outrepasser une lésion pendant la réplication est de changer de matrice ADN (*Template Switching*), soit avec le chromosome homologue, soit avec la chromatide sœur nouvellement répliquée au niveau de la lésion, en utilisant des mécanismes proches de la recombinaison homologue. Ce processus permet donc d'éviter les mutations qui peuvent être engendrées par le TLS (Zhang & Lawrence, 2005; Li *et al*, 2002; Xu *et al*, 2013; Ghosal & Chen, 2013)

Les deux types de voies de réparation post-répliquatives sont gérés par différents signaux. Pour le TLS, l'E3 ubiquitin ligase Rad18 complexée avec l'E2 ubiquitin ligase

Rad6, mono-ubiquitine PCNA au niveau de la lysine 164 (Figure 6) (Ting *et al*, 2010). Pour le changement de matrice, PCNA sera polyubiquitiné par le complexe Rad5-Ubc13-Mms5 *E2-E3 ubiquitin ligase* une fois mono-ubiquitiné (Ghosal & Chen, 2013; Miyase *et al*, 2005; Ulrich & Jentsch, 2000). Le mécanisme de ce mode de DDT est encore peu connu, tout comme les acteurs moléculaires qui y participent. Cependant, chez la levure, il semblerait que cela implique les mêmes voies de recombinaison homologue (Xu *et al*, 2013), et que l'activité hélicase de Rad5 pourrait permettre de dérouler la chromatide sœur nouvellement synthétisée pour pouvoir envahir un des brins et l'utiliser comme matrice à la place du brin endommagé (Blastyák *et al*, 2007).

Chez les métazoaires, en revanche, ce mécanisme a pour l'instant été très peu étudié. Même si la plupart des acteurs moléculaires de cette voie sont conservés, certains divergent. Par exemple Rad5 a deux homologues chez l'Homme : SHPRH et HLTF (Lee & Myung, 2008) qui joueraient tout de même un rôle dans la polyubiquitination de PCNA et dans le changement de matrice ADN. De plus, nous pouvons nous demander si cette voie, puisqu'elle n'engendre pas d'erreur, est plus sûre ? En effet, la potentielle toxicité de dérouler le double brin d'ADN nouvellement synthétisé en exposant des simple-brins, est discutée. De façon notable, des *checkpoints* comme rad53 sont activés par la formation de ces simple-brins au cours de ce processus, suggérant qu'il n'est pas tout à fait sans danger (Sogo *et al*, 2002).

Si le TLS est largement étudié chez la levure, et un peu chez l'Homme, les mécanismes qui gouvernent le choix entre l'une ou l'autre des voies de DDT restent un mystère. Pour certaines lésions, qui affecteraient les deux brins comme les ICLs, comme la seule matrice alternative est le chromosome homologue il est peut être préférable d'utiliser le TLS pour pouvoir poursuivre la réplication et éviter la perte de l'hétérozygotie. Ce mécanisme plutôt commun au cours de la duplication de l'ADN, engendre pourtant des erreurs lors la réplication et est donc à la base de mutations. La cellule doit alors « limiter les dégâts ». C'est pourquoi cette voie doit donc être finement régulée.

Récemment, entre Juin 2012 et Janvier 2013, une protéine humaine a fait l'objet de sept études dans six équipes différentes. Cette protéine, nommée C1orf124, Spartan ou encore DVC1 a été décrite comme ayant un rôle crucial dans la régulation du TLS (Ghosal & Chen, 2013; Ghosal *et al*, 2012; Centore *et al*, 2012; Juhasz *et al*, 2012; Kim *et al*, 2013; Machida *et al*, 2012; Davis *et al*, 2012; Mosbech *et al*, 2012). Bien que son rôle dans le TLS soit unanime, sa fonction moléculaire et son mode d'action restent flous. Spartan se localise à la

fourche de réplication, au niveau des dommages d'ADN. Elle interagit avec PCNA ubiquitiné grâce à son domaine PIP (*PCNA interacting protein*) et se lie à un groupement ubiquitine par son domaine à doigt de zinc, UBZ (*Ubiquitin Binding Zinc finger*). Au delà des mécanismes de base de Spartan, les articles publiés à son sujet ne sont pas totalement d'accord par rapport à sa fonction moléculaire. Quand certains défendent un rôle dans la stabilisation de PCNA et de son ubiquitination (Juhasz *et al*, 2012), d'autres prônent un rôle permettant d'éviter un TLS excessif, qui induirait des mutations par les polymérase dépassant la lésion. Le mécanisme proposé serait que Spartan recrute la ségrégase p97/VCP présentant une activité AAA-ATPase, au niveau de la fourche de réplication, une fois le dommage d'ADN dépassé. Cette dernière permettrait alors l'extraction de la fourche de réplication de la polymérase TLS présente, comme la polymérase η , afin d'éviter l'apparition de mutations dues à leur basse fidélité (Figure 7) (Davis *et al*, 2012; Mosbech *et al*, 2012; Kim *et al*, 2013). Finalement, aux vues des différentes fonctions décrites, on peut aussi penser que Spartan est nécessaire à plusieurs étapes du TLS : pour promouvoir l'échange entre une polymérase répllicative et TLS au niveau de la lésion, pour la stabilisation du complexe de TLS et enfin pour la limitation de l'extension par les polymérase TLS par le recrutement de p97 (Centore *et al*, 2012; Juhasz *et al*, 2012; Kim *et al*, 2013; Machida *et al*, 2012; Mosbech *et al*, 2012; Davis *et al*, 2012; Ghosal & Chen, 2013; Ghosal *et al*, 2012). La fonction de Spartan semble donc être très importante chez l'Homme pour permettre une réplication complète et avec le moins d'erreurs possible. En outre, cette protéine est hautement conservée parmi les animaux. Il est donc étonnant que sa fonction n'avait jamais été étudiée dans aucun organisme jusque là. Finalement, beaucoup de choses restent encore à explorer au niveau des mécanismes et de la régulation infiniment complexe de la réplication qui permettent de transmettre un génome intègre au cours des divisions.

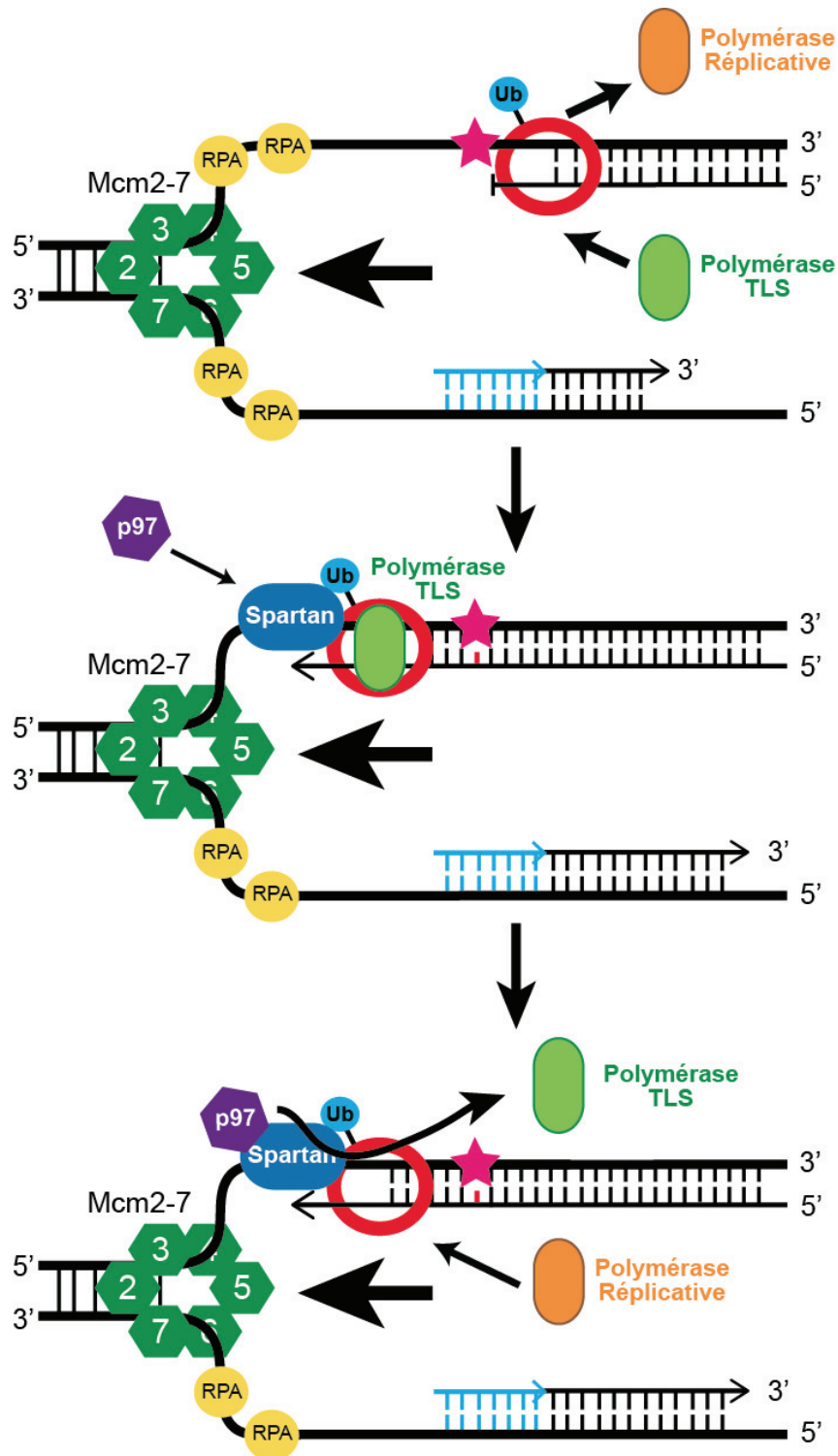


Figure 7: Mécanisme d'action proposé pour Spartan dans le TLS

Représentation schématique d'un des rôles proposés de la protéine Spartan. Cette protéine agirait au niveau de la fourche de réplication, une fois la lésion d'ADN outrepassée par les polymérase TLS. Spartan permettrait alors de recruter la ségrégase p97 pour extraire la polymérase TLS présente, et ainsi limiter les mutations qu'elle pourrait induire.

1.3. La Mitose

1.3.a. La condensation des chromosomes

Une fois la réplication du génome effectuée, pour que la cellule puisse se diviser et ségréger ses chromosomes, ceux-ci doivent être au préalable condensés. En effet, juste après la réplication, le noyau de la cellule contient de longues fibres d'ADN qui occupent tout l'espace. A titre d'exemple, la longueur de ces molécules est tellement importante, que chez les vertébrés, une fois organisées en nucléosomes, il faut encore les compacter plusieurs centaines de fois pour qu'ils forment des chromosomes. Cela permet de ségréger sans incident, de manière équitable et dans un espace très réduit, les deux jeux de chromatides sœurs (Saitoh *et al*, 1994). Le mécanisme de condensation est donc indispensable à la mitose et requiert des complexes qu'on appelle les complexes Condensines (I et II), qui ont d'abord été découverts à partir d'extraits d'œufs de xénope (Hirano *et al*, 1997; Hirano & Mitchison, 1994). Ces complexes sont composés de protéines SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*), les SMC 2 et 4, et de protéines non SMC, qui diffèrent selon qu'elles appartiennent au complexe Condensine I ou II. Les complexes Condensines ont une activité ATPase dépendante de l'ADN, ainsi qu'une activité *supercoiling* dépendante de l'ATP.

Dans le complexe Condensine I, les protéines non SMC sont CAP-G, CAP-D2 et CAP-H ou Barren chez la drosophile. Dans le complexe Condensine II ce sont les protéines CAP H2, CAP-D3 et CAP-G2 qui les remplacent. Le complexe Condensine permet de configurer la structure de l'ADN d'une façon dépendante de l'ATP grâce aux extrémités C-terminales des protéines SMC (Kimura & Hirano, 2000). Ces complexes forment une sorte de pince avec les protéines SMC grâce à leur long domaine s'enroulant sur lui même (le domaine *coiled-coil*), qui se referme grâce aux protéines non-SMC. Ces protéines sont hautement conservées parmi les eucaryotes. Chez *C. elegans*, alors que l'on pensait que le complexe Condensine I n'était pas présent, un homologue a été identifié il y a quelques années (Ford & Schumacher, 2009). Chez les procaryotes, le complexe n'est pas tout à fait le même. On trouve un seul type de protéine SMC (MukB chez *E. coli*) qui va former un homodimère pour former la pince qui se referme avec les deux protéines non-SMC (MukE et MukF chez *E. coli*) (Graumann & Knust, 2009). Même si dans ces organismes les séquences peptidiques ne sont pas conservées avec les protéines qui constituent le complexe Condensine chez les eucaryotes, leur structure et leur fonction sont homologues. En effet, MukB induit la

condensation de l'ADN bactérien, mais aussi la séparation de manière équitable des chromosomes à la mitose (Petrushenko *et al*, 2006).

La manière dont le complexe Condensine fonctionne est encore floue. En revanche, le fait que sa déplétion induise des chromosomes retardataires (ou *lagging chromosomes*) tout comme des ponts de chromatine est bien établi (Hirano, 2006; Hudson *et al*, 2009). Par rapport à son mécanisme moléculaire, ce complexe pourrait permettre la résolution des chromatides sœurs en détachant complètement les complexes Cohésines (voir plus bas) qui les appariant entre la métaphase et l'anaphase. Ensuite, il pourrait aussi permettre la décaténation des molécules d'ADN sœurs avec la participation de la topoisomérase II, qui coupe et ré-attache les brins d'ADN pour pouvoir individualiser correctement chaque chromatide. La fonction du complexe Condensine, ici, permettrait de tirer de chaque côté les deux chromatides sœurs, pendant l'action de la topoisomérase, rendant la réaction inverse improbable (Cuylen & Haering, 2011). Le possible rôle des Condensines dans le recrutement de la topoisomérase II est encore discuté. Enfin, ce complexe pourrait avoir un rôle dans la reconfiguration de la topologie des chromosomes mitotiques (Cuylen & Haering, 2011). Par exemple, le complexe purifié à partir d'œuf de xénope permet des super-enroulements positifs de façon dépendante de l'ATP (*positive supercoils*) avec la coopération de la topoisomérase I (Kimura & Hirano, 1997). Cette activité pourrait donc participer à la condensation des chromosomes.

1.3.b. L'appariement des chromatides sœurs

Une fois les chromosomes individualisés et condensés, ils vont devoir se préparer à l'anaphase. Pour cela, les chromatides sœurs devront s'apparier sur la plaque métaphasique grâce aux complexes Cohésines.

Le complexe Cohésine est composé de 4 sous-unités qui forment un anneau. Deux protéines : SMC 1 et 3, s'associent pour former une sorte de pince grâce à leur long domaine s'enroulant sur lui même (le domaine *coiled-coil*). Ensuite, la klésine Rad21 et stromal antigen (SA) referment cette pince pour terminer la forme en anneau de ce complexe

(Losada, 2014; Remeseiro & Losada, 2013). La structure des Cohésines est similaire à celles des Condensines, principalement dû à la présence d'un dimère de SMCs.

Le chargement au niveau de l'ADN des protéines du complexe Cohésine commence très tôt dans le cycle, bien avant la condensation des chromosomes, dès la phase G1 (Bernard *et al*, 2006; Ciosk *et al*, 2000). Pendant la réplication, elles maintiennent appariées les deux chromatides sœurs nouvellement synthétisées, sur toute la longueur du génome. En prophase, quand les chromosomes commencent à se condenser, la plupart des Cohésines sont alors libérées de la chromatine pour permettre la résolution de chacune des chromatides sœurs. Cette étape est gérée par trois kinases, cyclin-dépendent kinase 1 (CDK1), Aurora kinase B (AURKB) et polo-kinase 1 (PLK1) et pourrait faire intervenir le complexe Condensine. Enfin, en anaphase pour la séparation des deux jeux de chromosomes, les complexes Cohésines restant sur la chromatine aux niveaux des régions péricentromériques, sont clivés par la protéase Séparase (Sun *et al*, 2009; Hauf *et al*, 2001; Uhlmann *et al*, 2000). Ce mécanisme est indispensable à la ségrégation, de manière équivalente, des chromatides pendant la mitose. Le complexe Cohésine est donc encore un facteur indispensable au bon déroulement de la ségrégation des chromosomes et sa régulation approximative ou son absence peut entraîner des conséquences catastrophiques pour la survie de la cellule par des divisions défectueuses et l'apparition d'aneuploidie (Haarhuis *et al*, 2013; Handyside, 2012; Kenney & Heald, 2006).

I.3.c. La ségrégation des chromosomes

Une fois les chromatides sœurs correctement appariées, condensées et alignées sur la plaque métaphasique, il faut ensuite pouvoir les ségréger. Pour se faire, les fuseaux mitotiques composés de microtubules viennent s'attacher au niveau d'une structure complexe des chromosomes, faisant intervenir une multitude de protéines, appelée kinétochore. Cependant, la mise en place de ces kinétochores n'est permise que si la cellule reconnaît les territoires chromosomiques que sont les centromères. La plupart du temps, ils sont définis par la présence d'un variant d'histone H3 spécifique de cette région, CenH3 (CENP-A chez les mammifères, Cid chez la drosophile et Cse4 chez *Saccharomyces cerevisiae*) (Padeganeh *et al*, 2013). Celui-ci peut être capable de recruter les autres protéines qui constituent le

centromère ainsi que le kinétochore, sans vraiment cibler de séquences spécifiques de l'ADN (Plohl *et al*, 2014; Scott & Sullivan, 2014). Les mécanismes qui permettent de définir un centromère sont encore mal compris et font l'objet de nombreuses recherches.

Pour que la division de la cellule se déroule sans encombre, des points de contrôle (*checkpoints*) sont requis. Tout d'abord, des *checkpoints* sont activés si les fuseaux mitotiques ne sont pas totalement assemblés. En effet, sur les kinétochores, il existe des protéines qui, tant qu'elles sont présentes, inhibent l'entrée en anaphase. C'est ce qu'on appelle des *Spindle Assembly Checkpoints* (SACs), composés principalement de protéines Mad et Bub (Musacchio & Salmon, 2007). Tant que les chromosomes ne sont pas bien alignés sur la plaque métaphasique ou qu'ils ne sont pas correctement attachés par les fuseaux mitotiques, elles interviennent pour éviter une mitose défectueuse. Ces *checkpoints* sont aussi sensibles à la tension qu'exercent les microtubules sur les kinétochores appariés. Pour que les chromosomes se ségrègent correctement lors de l'anaphase, il faut qu'il y ait un nombre suffisant de microtubules attachés au niveau de ces structures. Plus il y a de microtubules attachés, plus la tension exercée sera forte. A partir d'une certaine tension, les protéines SAC se dissocieront des kinétochores et permettront la séparation des chromatides sœurs (Nicklas *et al*, 2001).

Bien que ne donnant qu'un aperçu de toutes les contraintes qu'il existe pour diviser sans encombre les chromosomes d'une cellule, j'ai tenté, à travers cette première partie d'introduction, de vous présenter la diversité des raisons qui peuvent mener à des mitoses défectueuses. Le sujet de ma thèse m'a en effet amené à essayer de comprendre ce qui pouvait engendrer des ponts de chromatine pendant la division des chromosomes. Je me suis donc retrouvée face à un très vaste et riche sujet. Néanmoins, même avec ces clefs en main, en m'intéressant à l'intégration des chromosomes paternels dans le zygote, il a également fallu comprendre ce qu'impliquait spécifiquement le premier cycle de division de l'embryon.

II. La division zygotique

Dans cette première partie nous avons pu aborder les étapes nécessaires à la duplication et à division des chromosomes de manière fidèle et équivalente, de façon générale. A présent, nous allons nous intéresser à une division cellulaire très particulière et indispensable aux organismes multicellulaires à reproduction sexuée : la division zygotique.

II.1. Les gamètes : Deux noyaux haploïdes bien distincts

La première division de l'embryon est très particulière car elle fait intervenir deux noyaux haploïdes provenant de gamètes d'origine complètement différente. Il va ensuite falloir les rassembler, pour obtenir ainsi le zygote, et les diviser pour aboutir à deux noyaux ou deux cellules diploïdes, formant le début du développement d'un embryon. Les deux gamètes qui procurent les deux noyaux haploïdes nécessaires à la formation et au développement d'un embryon sont le spermatozoïde d'une part et l'œuf d'autre part. Leur taille, leur forme, et leur organisation chromatinienne respectives diffèrent fortement (Saperas & Ausió, 2013; Kasinsky *et al*, 2011; Togashi *et al*, 2012; Braun, 2001). D'un côté, les gamètes femelles sont de grandes tailles, immobiles, et ont accumulé une grande quantité de transcrits et de protéines au cours de leur formation, qui pourront servir au moins, à la première division s'il y a fécondation. De l'autre, les gamètes mâles sont de petites tailles, mobiles, et ont un noyau inactif (Smith *et al*, 2013; Braun, 2001). La fonction principale du spermatozoïde étant de transporter son matériel génétique jusqu'à l'ovocyte, ce noyau a dû développer des stratégies lui permettant d'être le plus rapide et le plus protégé possible. Il est probable que la condensation extrême du noyau du sperme pourrait avoir un avantage pour sa mobilité (Malo *et al*, 2006), ainsi que pour la protection de son génome (Noblanc *et al*, 2013). La conformation du noyau du spermatozoïde étant unique, dans cette première partie, je me focaliserai donc sur la formation post-méiotique du gamète mâle.

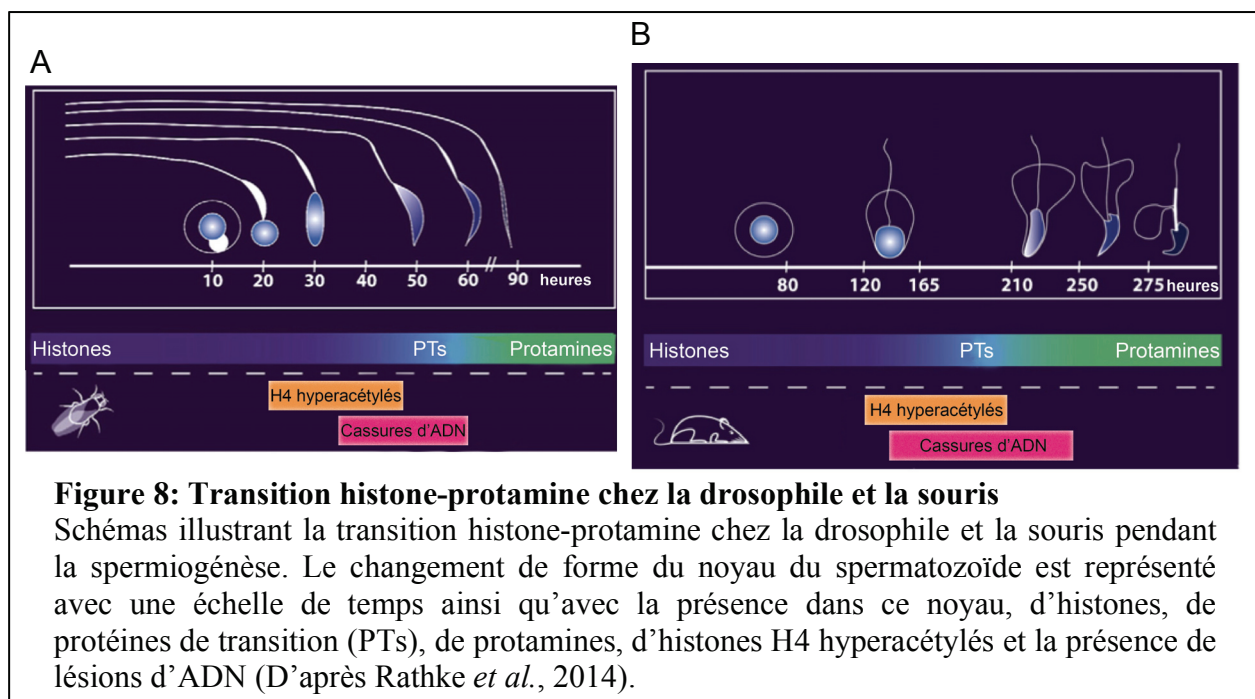
II.1.a. Le noyau du spermatozoïde : Une conformation chromatinienne unique

Dans le règne animal, le noyau du sperme a une conformation chromatinienne unique. Une fois la méiose mâle terminée, l'expression des protéines chromatiniennes spécifiques du spermatozoïde permettent le remplacement partiel, voire presque total, des histones par des SNBPs (*Sperm Nuclear Basic Protein*). Les plus connues sont les protamines, que l'on trouve chez les mammifères et qui sont riches en arginine, ainsi qu'en cystéine. Chez la drosophile, on trouve aussi des protéines de type protamine, un peu différentes de celles des mammifères. Elles sont aussi riches en cystéine mais moins en arginine. De plus, ces protéines ont une plus forte proportion en lysine que celles des mammifères (Jayaramaiah Raja & Renkawitz-Pohl, 2005) (nous les appellerons tout de même protamines par la suite). Cependant, même si les protamines ne sont pas bien conservées parmi les espèces et qu'elles évoluent très vite (Lewis *et al*, 2003), tous les animaux compactent leur ADN du sperme avec des SNBPs qui dériveraient de l'histone de liaison H1 (Lewis *et al*, 2004; Itoh *et al*, 1997; Ausió, 1999). Il en existe trois types : les protéines de type histone, les protéines de type protamine et les protamines (Ausió, 1999). Lors de la spermiogénèse, l'assemblage de la chromatine paternelle par les SNBPs change la conformation de l'ADN, qui devient bien différente des cellules somatiques (Kurtz *et al*, 2009). Chez le xénope par exemple, ce sont uniquement les histones H2A-H2B qui sont remplacées par des protéines chromosomiques spécifiques du sperme de type protamine (SP1-SP6), tandis que les histones H3 et H4 sont maintenues (Frehlick *et al*, 2006). Dans leurs gamètes mâles, la longueur d'ADN entre les connecteurs est bien plus importante que dans la plupart des cellules somatiques (Zalenskaya *et al*, 1981). L'assemblage particulier de la chromatine du spermatozoïde, est bien plus flagrant chez les espèces où les histones sont remplacées par les protamines. L'ADN n'est plus organisé en nucléosomes, mais se compacte de façon toroïdale (Braun, 2001). La proportion des SNBPs par rapport aux histones restantes varie selon les espèces. Chez l'homme, environ 15% des histones persistent dans le gamète mâle mature (Zhang *et al*, 2006), mais il peut y en avoir moins, comme chez la drosophile, ou plus comme c'est le cas chez le xénope. Dans tout les cas, il semblerait que cette conformation particulière inactive les fonctions de ce noyau, de façon plus ou moins drastique. Les nucléosomes restants serviraient à l'attachement de certains domaines avec la matrice nucléaire, qui aiderait la réplication post-fécondation (Shaman *et al*, 2007), mais peuvent également permettre de conserver l'identité de certains

territoires chromosomiques comme les centromères (Raychaudhuri *et al*, 2012) (voir plus bas).

II.1.b. Les mécanismes de condensation de la chromatine du sperme

Le remplacement des histones par les protéines de transition puis par les protamines au cours de la spermiogénèse (Figure 8) est un processus complexe dont les mécanismes moléculaires qui les régissent sont encore peu connus. Ces changements chromatiniens s'accompagnent notamment de cassures d'ADN transitoires, de la condensation du noyau et d'un changement drastique de sa forme (Figure 8) (Rathke *et al*, 2014). Au début de ce processus, l'éviction des histones débute par une vague d'hyperacétylation des histones H4 (Figure 8) (Rathke *et al*, 2007; Meistrich *et al*, 1992) ainsi que par le remplacement, chez la souris, de l'histone H2B par son variant TH2B (Montellier *et al*, 2013). Ces changements permettraient de relâcher la chromatine et de déstabiliser les nucléosomes, facilitant ainsi le remodelage du noyau du spermatozoïde. La plupart des acteurs responsables de l'enlèvement des histones, restent inconnus mais, chez la souris par exemple, la protéine à bromodomaine Brdt, a été identifiée comme requise pour le remplacement des histones H4 acétylées, par les protéines de transition (Gaucher *et al*, 2012). Ces dernières, elles aussi basiques sont,



déposées transitoirement pendant la condensation du noyau du spermatozoïde chez la plupart des animaux. Il a été démontré que les protéines de transition, pouvaient jouer un rôle pour relâcher l'ADN en baissant sa température de fusion (Akama *et al*, 1998), ainsi qu'en stimulant l'activité des topoisomérase I (Akama *et al*, 1999). Il existe deux types de topoisomérases : TopoI et TopoII. Les topoisomérases de type I ne coupent qu'un seul brin d'ADN et ré-attachent les deux extrémités, une fois le super tour relâché. Celles de type II sont aussi capables de changer la topologie de l'ADN, mais en induisant cette fois une cassure double-brin. L'activité des topoisomérases dans le remodelage de la chromatine du sperme pendant la spermatogenèse n'est aujourd'hui plus à démontrer. TopoIIB permet de réduire les super tours d'ADN qui sont imposés avec la compaction en nucléosomes chez les mammifères et chez la drosophile (Meyer-Ficca *et al*, 2011; Ward, 2011; Rathke *et al*, 2014). De façon surprenante, il semblerait aussi que les topoisomérases de type I et II, qui sont retrouvées dans le spermatozoïde mature se sont spécialisées, leur conférant des propriétés uniques comparées à leurs activités somatiques (Har-Vardi *et al*, 2007).

Même chez *C. elegans*, qui ne compacte pas son noyau du spermatozoïde avec des protamines, mais seulement avec des SNBPs de type histones, comme le variant d'histone H2A, HTAS-1 ou d'autres protéines comme les SCH (1-3) et GSP-4, la maturation de ce noyau requière la topoisomérase I (TOP-1) (Chu *et al*, 2006). Pendant la maturation du noyau du spermatozoïde, on assiste également à une condensation du noyau, même si celle-ci est différente des mammifères ou de la drosophile. De plus, l'activité transcriptionnelle semble réduite (Shakes *et al*, 2009). Il semblerait donc que ce noyau soit aussi inactivé pendant la spermiogénèse. Bien qu'impliquant des mécanismes différents entre les espèces, le remodelage de la chromatine du sperme serait un phénomène conservé parmi les animaux.

Si le remodelage de la chromatine du spermatozoïde implique l'activité des topoisomérases, cela devrait donc engendrer un grand nombre de cassures d'ADN, bien que transitoires (Rathke *et al*, 2014). En outre, un des effets secondaires de la réorganisation de la chromatine du sperme est l'inhibition de son activité cellulaire, le rendant vulnérable à tous types d'agressions extérieures. Puisque le spermatozoïde doit transporter son matériel génétique jusqu'à l'œuf et le transmettre à l'embryon, nous pouvons nous demander quel est l'intérêt de ces mécanismes qui mettent en péril l'intégrité de l'ADN paternel.

II.1.c. Rôles supposés de la compaction extrême du noyau du sperme

Le rôle du réarrangement de la chromatine paternelle reste encore relativement mystérieux. Les protamines sont des protéines avec un des plus hauts taux de variation dans l'évolution (Oliva, 2006). La lignée germinale mâle étant soumise à une forte pression de sélection, le remodelage de la chromatine paternelle procurerait donc un avantage. Dans le cas d'une condensation du noyau du sperme avec des protamines, le noyau prend une forme allongée et très compactée. Le niveau élevé d'arginine dans ces protéines permettrait une très forte liaison avec l'ADN tandis que les cystéines seraient responsables de la formation de ponts disulfures, essentiels à la forte compaction de la chromatine retrouvée dans le sperme. Certains ont donc fait l'hypothèse que cette forme pourrait être requise pour des fonctions hydrodynamiques (Braun, 2001; Oliva, 2006). Par exemple, des expériences de nage de spermatozoïdes de cerfs ont montré que ceux ayant les têtes les plus allongées nageaient plus vite (Malo *et al*, 2006). D'autres ont supposé que cette compaction permettait de protéger le génome du spermatozoïde. Une étude a ainsi montré qu'en abaissant la quantité de protamine exprimée, la forme des noyaux du sperme était affectée ainsi que leur résistance à certaines perturbations chimiques (Cho *et al*, 2001). Une autre étude a montré que les parties du noyau du spermatozoïde compactées avec des protamines sont bien plus résistantes aux dommages oxydatifs, que l'on peut rencontrer physiologiquement dans l'épididyme, que les parties encore organisées sous forme de nucléosomes (Noblanc *et al*, 2013).

En plus de conférer une forme hydrodynamique au noyau du sperme et de protéger l'intégrité de son génome, les protamines peuvent être indispensables à la fertilité. Chez la souris, les mutants déficients pour au moins un des deux gènes codants les protamines (*Prm1* et *Prm2*) sont complètement stériles car ne produisant pas de spermatozoïdes matures (Cho *et al*, 2001). Chez la drosophile cependant, la délétion des deux gènes de protamine (*Mst35Ba* et *Mst35Bb*) n'engendre ni stérilité, ni changement majeur de forme. Seules une torsion anormale de ces noyaux et une diminution de la fertilité ont été mises en évidence (Tirmarche *et al*, 2014; Rathke *et al*, 2010). Par contre, une augmentation de la sensibilité aux rayons X a été décrite, suggérant là encore, un rôle de protection du génome paternel par les protéines de type protamine de drosophile (Rathke *et al*, 2010).

Il existe des protéines de type H1 spécifiques au spermatozoïde qui joueraient un rôle de liaison entre ses composants chromatinien. Chez les mammifères, l'une d'entre elle se

nomme HILS-1 (*spermatid-specific histone H1-like*). Elle est impliquée dans le remodelage de la chromatine pendant la spermiogénèse (Yan *et al*, 2003). Chez la drosophile, son homologue Mst77F, est indispensable à la fertilité des mâles ainsi qu'à la forme en aiguille du noyau du sperme (Rathke *et al*, 2014, 2010).

Finalement, bien que la transition histone-protamine engendre des lésions d'ADN (Rathke *et al*, 2007), l'hypercondensation de la chromatine du noyau du sperme présenterait un avantage quant à la protection du génome paternel et lui confèrerait, par une forme hydrodynamique, sa capacité à féconder l'œuf.

II.2. La fécondation

Si la condensation du noyau du spermatozoïde est un phénomène bien conservé chez les animaux, il n'en demeure pas moins que le noyau haploïde qui entrera dans l'œuf sera complètement incapable de se répliquer et de se diviser. Le processus « inverse » que l'on trouve pendant la spermiogénèse va donc devoir être établi. La reconfiguration de la chromatine du spermatozoïde en nucléosomes est une étape essentielle, puisqu'elle permet non-seulement d'obtenir un ADN fonctionnel, mais aussi de pouvoir reformer son enveloppe nucléaire, démantelée juste après la fécondation, et plus particulièrement d'assembler les complexes de pores nucléaires, indispensables à la fonction du noyau (Inoue & Zhang, 2014). Si le remodelage de la chromatine du spermatozoïde pendant la spermiogénèse est un processus lent prenant plusieurs jours (Rathke *et al*, 2014), son processus inverse à la fécondation est en revanche beaucoup plus rapide (de l'ordre de quelques minutes chez la drosophile et moins de 30 minutes chez la souris).

Dans l'ovocyte, le pronoyau femelle, que va rencontrer le noyau du spermatozoïde est, quant à lui, resté organisé en nucléosomes. Néanmoins sa chromatine subit beaucoup de changements épigénétiques pendant l'ovogénèse pour, par exemple, éteindre l'expression de ses gènes (Bonnet-Garnier *et al*, 2012; De La Fuente, 2006). A la fécondation, la méiose femelle, qui s'était arrêtée (en métaphase de méiose II pour les mammifères et en métaphase de méiose I chez la drosophile), reprend le cours de son cycle afin de terminer la formation de

son noyau haploïde (Figure 9). Pendant ce temps, la chromatine paternelle sera remodelée par des protéines d'origine maternelle, stockées dans l'œuf et se décondensera pour permettre la réplication. Les deux pronoyaux une fois fusionnés ou seulement apposés, comme c'est le cas chez la drosophile, commenceront leur premier cycle ensemble pour pouvoir former deux noyaux diploïdes, à la fin de celui-ci. Ces premières étapes du développement chez la drosophile, qui ont fait l'objet de ma thèse, sont schématisées en Figure 9.

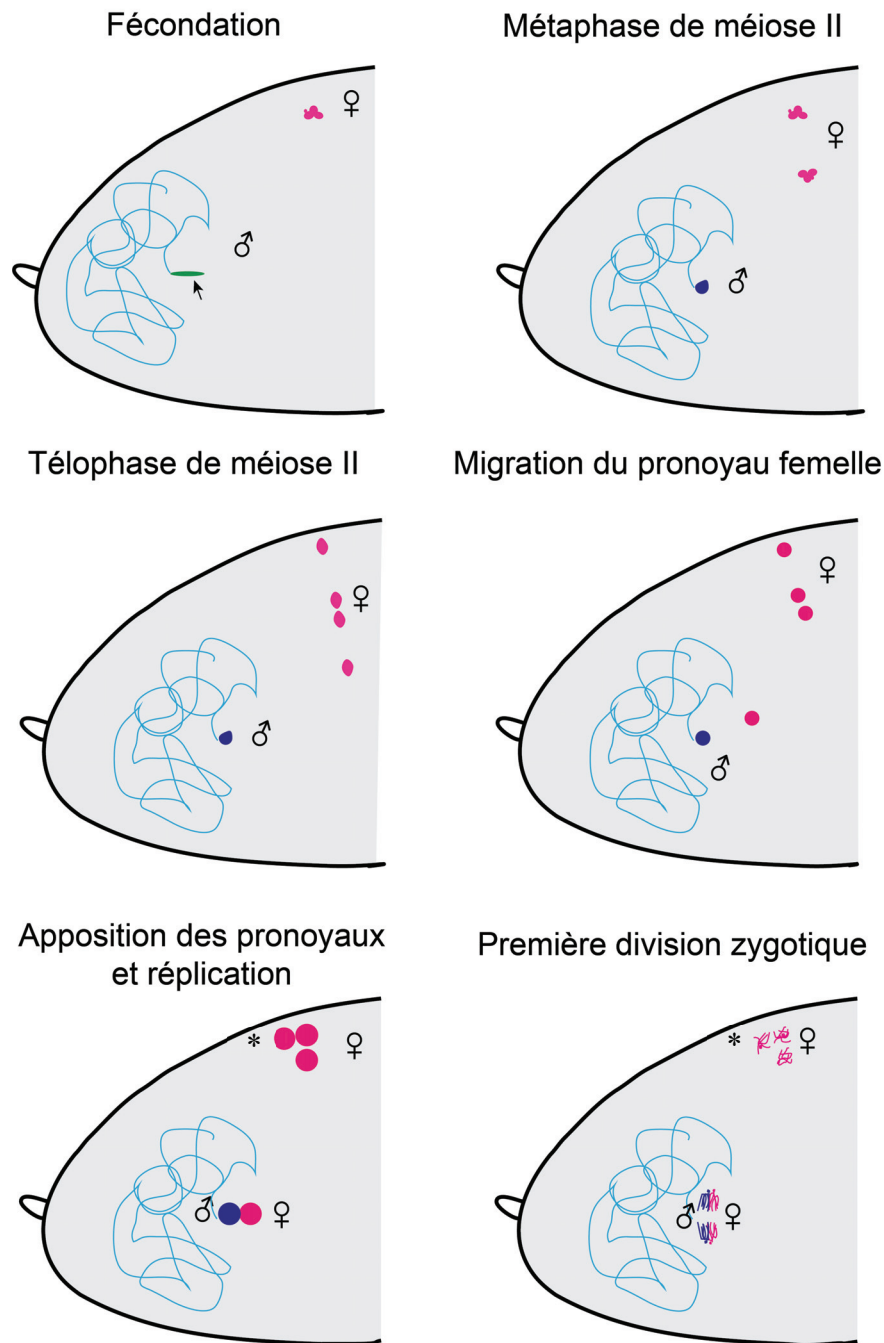


Figure 9: Schémas représentant la formation du zygote chez la drosophile

A la fécondation (en haut à gauche), le noyau du spermatozoïde (flèche), entre dans l'œuf avec son flagelle (bleu clair). Sa chromatine est compactée avec des protamines (vert). La méiose femelle (rose), arrêtée en métaphase de méiose I est réactivée. Très rapidement, au moins dès la métaphase de méiose II, les protamines sont totalement remplacées par des histones (bleu). Une fois la méiose terminée, le pronoyau femelle migre vers le pronoyau mâle. Ils répliquent ensuite leur ADN à l'apposition et entrent en première mitose. Les globules polaires (étoiles) restent sur la périphérie de l'embryon. La chromatine paternelle et maternelle est indiquée avec des symboles.

II.2.a. La décondensation du noyau du sperme à la fécondation

A la fécondation, la première étape consiste à enlever les protéines chromatiniques spécifiques du spermatozoïde qui inhibent l'activité du noyau mâle. Les mécanismes qui entrent en jeu pour cette étape sont encore très mal connus. L'obstacle qui se pose ici, pour le décryptage de ces processus, est une accessibilité difficile des événements intervenants juste après la fécondation. Chez les mammifères, pour étudier le remodelage de la chromatine paternelle, la technique de fécondation *in vitro* est indispensable. Chez l'Homme, bien sûr, la fécondation n'est pas étudiée pour des raisons éthiques. Seules des expériences de décondensation du noyau du spermatozoïde sont engagées. Chez le xénope, beaucoup d'études sont entreprises avec des extraits d'œufs et du sperme purifié, ce qui ne reproduit malheureusement pas les conditions physiologiques normales. Le modèle de *C. elegans* est très intéressant car on peut observer directement le processus de fécondation grâce à sa cuticule transparente. Enfin, chez la drosophile, les premières étapes de la formation du zygote peuvent être étudiées en récoltant des œufs fécondés venant d'être pondus. Malheureusement, le phénomène d'éviction des protamines se fait de manière tellement rapide que l'observation de cette étape est rendue impossible par les contraintes techniques.

Des tentatives pour comprendre l'enlèvement des SNBPs ont été entreprises avec du sperme de xénope purifié et des extraits d'œufs, ce qui a permis de mettre en évidence le rôle de la nucleoplasmine dans la décondensation du noyau du spermatozoïde (Philpott & Leno, 1992; Philpott *et al*, 1991; Rice *et al*, 1995). Les évidences pour décrypter sa fonction moléculaire manquent, mais sa forte affinité aux histones laisserait supposer qu'elle est requise pour échanger les protéines basiques du sperme par les histones. Cette protéine a aussi été impliquée dans la décondensation du noyau de spermatozoïde de plusieurs animaux incluant le xénope et la souris (Philpott & Leno, 1992; Philpott *et al*, 1991; Inoue *et al*, 2011; Burns *et al*, 2003). Le rôle de la nucléoplasmine dans le zygote de drosophile n'a par contre jamais été étudié jusqu'à présent.

Une autre protéine a également été impliquée dans ce processus chez le xénope, TAF-I (*Template Activating Factor-1*) qui interviendrait en se liant aux SNBPs (Matsumoto & Nagata, 1999). Chez la drosophile, des expériences *in vitro* avec du sperme de xénope ont aussi été conduites et ont permis d'identifier les protéines P22 ainsi que DF31 comme jouant un rôle dans la décondensation du noyau du spermatozoïde (Crevel & Cotterill, 1995;

Kawasaki *et al*, 1994). Toutefois, le noyau du sperme de xénope n'étant pas condensé avec les mêmes protéines de type protamine, ces expériences n'apportent pas de réelles preuves quant à l'implication de ces acteurs dans la fécondation chez la drosophile. De plus, il a été montré par les expériences *in vitro* de décondensation du sperme de xénope, que les histones pouvaient être incorporées au niveau de l'ADN et former des structures nucléosomales de façon spontanée dans ce contexte, rendant l'interprétation de ces résultats difficile.

Chez l'Homme, des expériences de décondensation du noyau du sperme ont mis en évidence le rôle d'agents réducteurs tel que le glutathion réduit, qui permettrait de réduire les ponts disulfures induits entre les protamines riches en cystéine. Il coopérerait avec du sulfate d'héparane, naturellement présent dans les ovocytes des mammifères (Julianelli *et al*, 2012; Romanato *et al*, 2008). Ce dernier jouerait un rôle d'accepteur de protamines grâce à ses charges négatives. Cependant son fonctionnement dans la décondensation du noyau du sperme, nécessite que la chromatine paternelle soit déjà partiellement décondensée par la réduction des ponts disulfures.

Chez l'oursin, une protéase de la famille des cathepsines L a été décrite comme permettant la dégradation des SNBPs de type histone du spermatozoïde. Cette protéine a aussi été montrée comme indispensable aux premières étapes du développement (Morin *et al*, 2012). Chez le lapin, une autre protéase, l'acrosinlike, a également été impliquée dans la dégradation des protamines (Zirkin *et al*, 1980). Néanmoins, le rôle des protéases dans la décondensation du noyau du spermatozoïde à la fécondation, reste inconnu chez les autres espèces.

A l'instar de la réplication ou de la réparation de l'ADN, où les histones sont incorporées grâce à des chaperons au moment de la synthèse d'ADN, le défi, ici, est d'assembler ces protéines de façon indépendantes de la réplication. De façon intéressante, ce ne sont pas les histones canoniques qui sont mises en place, mais certains variants. Pour l'histone H3, c'est uniquement le variant d'histone H3.3 qui est chargé sur la chromatine paternelle par le complexe HIRA (Lin *et al*, 2014; Inoue & Zhang, 2014; Orsi *et al*, 2013; Bonnefoy *et al*, 2007; Torres-Padilla *et al*, 2006; Loppin *et al*, 2005a, Loppin *et al*, 2000). Chez la drosophile, le complexe HIRA a pour fonction essentielle de déposer le variant d'histone H3.3 dans le pronoyau mâle de façon indépendante de la réplication (Bonnefoy *et al*, 2007; Loppin *et al*, 2005a; Loppin *et al*, 2000), tandis que chez la souris, ce complexe est aussi requis pour le remodelage de la chromatine maternelle afin de réactiver sa transcription

à la fécondation (Lin *et al*, 2014). Enfin, chez la carpe, HIRA est requise pour la décondensation du noyau du sperme ainsi que pour le développement de l'embryon, mais son implication dans l'incorporation de H3.3 est inconnue (Wang *et al*, 2013; Zhao *et al*, 2011).

L'incorporation d'histones seule, n'est pas suffisante pour recréer un noyau fonctionnel. Chez la drosophile, bien que HIRA permette de fournir des histones au noyau mâle, cette protéine n'est pas suffisante pour la formation du pronoyau mâle. CHD1, un moteur moléculaire impliqué dans l'assemblage de la chromatine *in vitro* (Lusser *et al*, 2005), est aussi requis pour la décondensation du noyau du spermatozoïde au moment de la formation *de novo* des nucléosomes à la fécondation (Konev *et al*, 2007). Dans les œufs pondus par les femelles mutantes pour *chd1*, bien que le pronoyau mâle ait incorporé des histones H3.3, son noyau reste très condensé. D'après sa fonction moléculaire décrite *in vitro*, CHD1 pourrait permettre d'espacer les nucléosomes nouvellement formés de façon régulière pendant le remodelage de la chromatine paternelle (Orsi *et al*, 2009; Konev *et al*, 2007). Chez le xénope, des études *in vitro* ont également montré que la décondensation du noyau du sperme est associée à l'incorporation du variant d'histone H2A.X phosphorylé avant la première réplication, en même temps que l'histone canonique H2A elle aussi phosphorylée (Dimitrov *et al*, 1994). Cependant, à l'exception du dimère H3.3/H4, les mécanismes d'incorporation des histones qui forment le nucléosome dans le noyau mâle, indépendamment de la réplication, sont par contre inconnus. Parallèlement, la chromatine maternelle, qui reste assez stable pendant la méiose et la formation de l'ovocyte subit moins de remodelage de sa chromatine avant la première mitose. Chez les mammifères ou chez *C.elegans*, la reprise de la transcription, inhibée pendant l'ovogénèse, engendre quelques changements comme l'incorporation d'histones H3.3, qui serait associée à la reprogrammation des génomes maternel et paternel à la fécondation (Lin *et al*, 2014; Ooi *et al*, 2006).

II.2.b. La maintenance de l'intégrité du génome paternel

Sachant que le remodelage de la chromatine du spermatozoïde pendant la spermiogénèse engendre des cassures d'ADN, il est fort probable que le processus de réincorporation d'histones dans le pronoyau mâle induise également des lésions.

L'apparition de foyers γ H2A.X dans les deux pronoyaux, sans induction exogène de dommages, pourrait illustrer la reprogrammation des génomes des deux pronoyaux à la fécondation et la déméthylation des deux jeux de chromosomes, qui permettent la totipotence des cellules embryonnaires (Ziegler-Birling *et al*, 2009; Wossidlo *et al*, 2010). En effet, à la fécondation, les empreintes de méthylations sont enlevées pour permettre, par exemple, l'expression de gènes indispensables pour les premières étapes du développement. En particulier, chez les mammifères, l'ADN paternel subit une perte de méthylation très forte et très rapide au moment de la formation du zygote (Guo *et al*, 2014; Oswald *et al*, 2000). Ce processus est accompagné d'une vague de réparation de la chromatine par la voie de réparation d'excision de base (*Base excision repair* : BER) (Wossidlo *et al*, 2010). Chez la drosophile, sachant que la méthylation de l'ADN est presque absente, ce processus n'est vraisemblablement pas requis à la fécondation.

La phosphorylation de l'histone H2A.X, habituellement utilisée comme un marqueur de réparation des cassures d'ADN, est, dans le cas du remodelage de la chromatine paternelle à la fécondation, plutôt associée avec l'incorporation d'histones et la décondensation du noyau mâle (Wossidlo *et al*, 2010; Ziegler-Birling *et al*, 2009; Dimitrov *et al*, 1994). Si chez la souris, dans des conditions normales la plupart des foyers γ H2A.X ne colocalisent pas avec 53BP1, un autre marqueur de réparation de l'ADN, cela n'exclut pas la présence de dommages qui pourraient être induits par l'assemblage de la chromatine paternelle (Ziegler-Birling *et al*, 2009). En effet, sachant que la topoisomérase est impliquée dans la transition histone-protamine lors de la spermiogénèse, son implication dans le processus inverse est fortement soupçonnée, ce qui pourrait engendrer des lésions d'ADN très transitoires (Derijck *et al*, 2006; Bizzaro *et al*, 2000).

De façon notable, il semblerait que pendant la formation et le stockage du spermatozoïde, son ADN soit soumis à des agressions extérieures pouvant fortement affecter son intégrité. La présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), produites par la production des spermatozoïdes, dans le testicule humain, a par exemple été reportée dans l'épididyme (Sakkas & Alvarez, 2010). Il semblerait aussi que plus les spermatozoïdes sont stockés, plus ils accumulent de lésions. Par exemple, les spermatozoïdes testiculaires comportent moins de fragmentation d'ADN que ceux éjaculés (Steele *et al*, 1999). Puisque la réparation de l'ADN est inactivée dans ce noyau hypercondensé, il apparaît évident que des stratégies de réparation post-fécondation soient mises en place afin de transmettre une information génétique paternelle intègre.

Une activité de réparation d'origine maternelle, est en effet présente très tôt, juste après la fécondation. En causant des lésions dans le noyau du sperme de façon artificielle, plusieurs études ont démontré que c'est à la fécondation, peu de temps après la fusion des deux pronoyaux chez les rongeurs, que l'ADN paternel va être réparé en utilisant différentes voies de réparation (Wossidlo *et al*, 2010; Derijck *et al*, 2008, 2006).

II.2.c. La transmission des territoires chromosomiques

Un autre déficit engendré par le remodelage de la chromatine du gamète mâle avec des SNBPs, est la perte, au moins en partie, des informations épigénétiques. Dans le spermatozoïde, il n'y a donc plus d'euchromatine ou d'hétérochromatine, contrairement à la chromatine maternelle qui conserve certaines de ses marques. A la fécondation, la « réinitialisation » de la chromatine paternelle engendre donc une asymétrie au niveau de la composition en histone comme au niveau de leurs modifications post-traductionnelles dans les deux pronoyaux parentaux (Burton & Torres-Padilla, 2010). Cependant, certaines identités sont maintenues, comme les territoires chromosomiques que sont les centromères ou les télomères. En effet, pour que la chromatine paternelle puisse se diviser à la première mitose, la rapide identification de ces territoires semble être indispensable.

L'identité des centromères est une condition *sine qua none* à la division correcte des chromosomes. Chez la drosophile, l'identité de ce territoire est permise grâce au variant d'histone Cid. C'est une des rares régions qui, à la spermiogénèse, conserve ses histones, qui seront transmises lors de la fécondation. Leur perte dans le sperme mature engendre, à la formation du zygote, une incapacité des chromosomes paternels à se diviser, résultant ainsi en la formation d'embryons haploïdes gynogénétiques (Raychaudhuri *et al*, 2012). Cependant, même si le variant d'histone CenH3 est nécessaire pour garder l'identité des centromères dans la plupart des organismes, il existe quelques exceptions. Par exemple, dans l'espèce holocentrique qu'est *C. elegans*, l'histone centromérique est perdue pendant la spermatogénèse et réapparaît lors de la fécondation (Gassmann *et al*, 2012).

L'identité des télomères est elle aussi indispensable à l'intégrité des chromosomes et à la survie de la cellule. Leur protection empêche leur dégradation et leur fusion. Chez la

drosophile, la structure des télomères est très particulière, puisqu'elle n'utilise pas de télomérase pour maintenir leur longueur. A la place, ceci est assuré par trois rétrotransposons différents. Pour protéger l'extrémité de ces structures d'éventuelles fusions, des protéines de coiffe sont utilisées, ce sont les protéines HP1, HOAP et HipHop (Gao *et al*, 2010; Rong, 2008). Pendant la spermatogénèse, l'une de ces protéines (HipHop) est remplacée par une protéine télomérique spécifique du spermatozoïde, K81. L'inactivation ou l'absence de cette protéine engendre une stérilité mâle, bien que les gamètes soient produits en quantité normale et qu'ils sont capables de féconder des œufs (Dubruille *et al*, 2010; Loppin *et al*, 2005b; Gao *et al*, 2011; Yasuda *et al*, 1995). Le problème se manifeste alors à la fécondation. Les extrémités des chromosomes non protégées dans le sperme seraient reconnues par les voies de réparation des cassures double-brins. Les fusions de télomères ainsi engendrées dans la chromatine paternelle rendent les chromosomes totalement incapables de se diviser et forment un pont de chromatine à la première mitose, ce qui mène là encore, à la formation d'embryons haploïdes gynogénétiques (Dubruille *et al*, 2010; Loppin *et al*, 2005b; Gao *et al*, 2011). Juste avant ma thèse j'ai pu participer à la découverte de la fonction télomérique de K81, dont le mutant est létal embryonnaire à effet paternel. Cet article vous est donc présenté en Annexe.

Chez les mammifères, très peu de choses sont connues par rapport à la structure des télomères dans le sperme. Leur longueur varierait selon le stade de la spermatogénèse et de longs télomères seraient transmis à la fécondation (Zalenskaya & Zalensky, 2002). Même si l'organisation des extrémités des chromosomes chez la drosophile est bien distincte de celle des autres animaux, il existe par exemple chez l'Homme, un complexe qui les coiffe, le complexe *shelterin*, composé entre autres, des protéines TRF1 et TRF2. Au cours de la spermatogénèse, ces protéines sont perdues et remplacées par des protéines liant les télomères du sperme (STBP) dont un variant spécifique de l'histone H2B (Gineitis *et al*, 2000; Zalensky *et al*, 1997). Cependant aucune preuve n'a été donnée quant à l'importance de ces protéines à la fécondation.

A travers cette introduction nous avons pu nous rendre compte de l'extrême complexité qu'implique la division des chromosomes. Cette complexité est d'autant plus exacerbée quand il ne s'agit plus seulement de « recopier » et de perpétuer l'existant, mais de devoir reformer un noyau intègre et compétent pour la réplication et la division des chromosomes. Pour tenter de mieux comprendre les mécanismes qui entrent en jeu dans la

formation du pronoyau mâle à la fécondation, l'équipe d'accueil dans laquelle j'ai effectué ma thèse étudie des mutations rares à effet parental, qui affectent l'incorporation des chromosomes paternels dans le zygote de drosophile et qui mènent à la formation d'embryons haploïdes.

Dans ce contexte, le mutant à effet maternel, *maternal haploid (mh)* (Gans *et al*, 1975; Zalokar *et al*, 1975) produit des embryons en quantité et à l'aspect normal. Cependant les femelles sont totalement stériles et produisent des embryons haploïdes gynogénétiques résultant de la perte des chromosomes paternels à la première division zygotique (Loppin *et al*, 2001).

Ma thèse s'est principalement articulée autour de la caractérisation du rôle de la protéine MH dans la formation du pronoyau mâle à la fécondation. Ceci m'a également conduit à me questionner sur le rôle que d'autres facteurs pouvaient jouer au moment de la première division zygotique. Dans la première partie de la section Résultats et Discussions, je présenterai les travaux que j'ai effectués sur cette protéine si mystérieuse. Dans une deuxième partie, j'exposerai les travaux que j'ai pu mener sur la fonction de protéines pouvant être impliquées dans le mécanisme de condensation des chromosomes. Je me concentrerai notamment sur la caractérisation du rôle du complexe ORC, dans la formation des pronoyaux mâle et femelle compétents pour la réplication.

Finalement, l'étude des mécanismes qui entrent en jeu dans l'assemblage *de novo* de la chromatine paternelle, indépendant de la réplication, pendant la formation du zygote, apporte une situation unique qui permet, dans un champ plus large, de mieux comprendre les enjeux épigénétiques et ceux de la maintenance de l'intégrité de l'ADN, auxquels un noyau est confronté pour lui permettre de se diviser.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. L'orthologue de Spartan, Maternal Haploid est essentiel à l'intégrité des chromosomes paternels dans le zygote de drosophile.

1.1. Historique du mutant maternal haploid

Dans cette première partie des Résultats, j'ai souhaité tout d'abord, vous introduire d'où venait le mutant qui a rythmé ma thèse.

En 1975, est né le mutant *maternal haploid* (*mh*). Son allèle d'origine, *mh¹* (ou *fs(1)1182*) a été isolé par un crible ethyl methane sulfonate (EMS) conçu pour isoler des mutations sur le chromosome X qui rendent les femelles stériles mais qui n'affectent pas leur viabilité (Gans *et al*, 1975). Ensuite, les mutants isolés dans ce crible, pondant des œufs d'aspect normal qui n'arrivaient jamais à éclore en larves, ont été classés en fonction des défauts de développement qui ont pu être observés. Ultérieurement, il a été décrit que les femelles mutantes pour *mh* pondaient des œufs haploïdes (Zalokar *et al*, 1975). Cette capacité à former des noyaux haploïdes a été utilisée pour générer des lignées de cellules haploïdes (Debec, 1984; Santamaría & Gans, 1980; Debec, 1978). Très rapidement, ce mutant a aidé à l'étude de la transition mid-blastuléenne (*midblastula transition* ou MBT), où à partir du cycle 13 de l'embryon, les cycles vont se ralentir, les phases G1 et G2 vont apparaître et la transcription zygotique va être activée. Le mutant *mh*, produisant des embryons haploïdes, a été utilisé dans ce contexte. Il a permis de montrer que le ratio entre les noyaux et le cytoplasme, était important pour ralentir la durée des cycles. En effet, dans les embryons haploïdes *mh*, comme il y a la moitié d'ADN que dans les embryons sauvages, cette transition se fait avec un cycle de retard (Lu *et al*, 2009; Grosshans *et al*, 2003; Edgar *et al*, 1986).

Par la suite, plus de 25 ans après l'isolation de cette mutation, le Dr. Benjamin Loppin a caractérisé son phénotype de manière cytologique. Il a pu mettre en évidence que dans les œufs pondus par les femelles *mh¹* (que nous appellerons par la suite œufs *mh¹*), les chromosomes paternels étaient perdus lors de la première mitose zygotique, car ils ne parvenaient pas à se diviser et formaient un pont de chromatine (Loppin *et al*, 2001). Cependant, bien que ce mutant ait été largement utilisé et étudié au niveau cytologique, l'identification de son gène s'est avérée plus difficile que prévu. Le chromosome X était tout

d'abord mal annoté dans la région d'intérêt. Ensuite, les déficiences disponibles pour procéder à des tests de complémentation n'étaient pas assez restrictives pour mettre en évidence le gène de *mh*. Enfin, une autre mutation létale embryonnaire à effet maternel, juste en amont du gène de *mh*, était associée à l'allèle d'origine, rendant son identification encore plus complexe. La mise à disposition de nouveaux outils génétiques avant ma thèse nous a permis l'identification de *mh* ainsi que la caractérisation de la fonction de la protéine qu'elle code.

mh est *CG9203*, un gène codant pour une protéine présentant des homologies avec les doigts de zinc de type UBZ de Rad18, une *E3 ubiquitin ligase* impliquée dans la réparation de l'ADN. Immédiatement, nous avons pu nous rendre compte qu'elle présentait deux domaines différents bien conservés, deux domaines UBZs, ainsi qu'un domaine SprT. Nous avons pu voir que cette protéine (définie comme l'association d'un domaine SprT ainsi que d'au moins un UBZ) était bien conservée chez les animaux, et particulièrement au niveau de leur domaine SprT. De façon remarquable, aucun orthologue de MH n'avait été caractérisé jusque là. La seule chose qui existait sur l'une de ces protéines, était une étude systématique de la localisation subcellulaire de protéines humaines fusionnées à la CFP ou l'YFP. Exprimé grâce à des plasmides en cellules en culture, l'orthologue humain de MH, C1orf124, semblait se localiser en foyers nucléaires (Simpson *et al*, 2000).

Le domaine SprT, retrouvé dans très peu de protéines dans chaque espèce (2 chez l'Homme et 4 chez la drosophile), n'avait jamais été étudié fonctionnellement. Pourtant, au vu de son haut degré de conservation, ce domaine semblait être important pour la fonction de la protéine MH.

Plus de 10 ans après la caractérisation cytologique de son phénotype, l'identification de *mh* comme *CG9203*, m'a permis, pour ma thèse, de redémarrer un projet mis en pause depuis plusieurs années.

Nous n'étions d'ailleurs pas les seuls à nous intéresser à cette protéine. Le choc a été de constater que six autres groupes dans le monde étaient aussi intrigués que nous sur la fonction qu'avait la protéine MH chez l'Homme (Spartan/DVC1). Les sept articles publiés en l'espace d'environ 6 mois, n'ont cependant pas permis de résoudre le mystère de MH, puisque la fonction décrite restait encore floue.

Bien que sa fonction moléculaire reste encore énigmatique, j'ai tenté à travers cet article de souligner l'importance de son rôle dans le zygote de drosophile. Nous avons pu

montré ici, que la fonction somatique de Spartan dans le TLS était conservé chez la drosophile. Cependant, le rôle essentiel de MH pour former un pronoyau mâle capable de s'intégrer dans le zygote, ne relève pas du TLS canonique. En effet, MH n'est pas présente pendant la réplication du génome paternel et les acteurs impliqués dans ce processus ne fonctionnent pas pendant la décondensation du pronoyau mâle. De façon alternative, nous montrons que MH serait requise pour maintenir l'intégrité du génome paternel avant qu'il entre dans la première réplication zygotique.

I. 2. Article : The Spartan Ortholog Maternal Haploid is Required for Paternal Chromosome Integrity in the Drosophila Zygote

The Spartan Ortholog Maternal Haploid Is Required for Paternal Chromosome Integrity in the *Drosophila* Zygote

Laetitia Delabaere,¹ Guillermo A. Orsi,^{1,2}

Laure Sapey-Triomphe,¹ Béatrice Horard,¹ Pierre Couble,¹ and Benjamin Loppin^{1,*}

¹Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR5534, Université Claude Bernard Lyon 1, University of Lyon, Villeurbanne 69100, France

Summary

The animal sperm nucleus is characterized by an extremely compacted organization of its DNA after the global replacement of histones with sperm-specific nuclear basic proteins, such as protamines [1, 2]. In the absence of DNA repair activity in the mature gamete, the integrity of the paternal genome is potentially challenged by the unique topological constraints exerted on sperm DNA [3]. In addition, the maintenance of paternal DNA integrity during the rapid remodeling of sperm chromatin at fertilization has long been regarded as a maternal trait [4]. However, little is known about the nature of the egg proteins involved in this essential aspect of zygote formation [5, 6]. We had previously characterized the unique phenotype of the classical *Drosophila* maternal effect mutant *maternal haploid* (*mh*), which specifically affects the integration of paternal chromosomes in the zygote [7]. Here we show that MH is the fly ortholog of the recently identified human DVC1/Spartan protein, a conserved regulator of DNA damage tolerance [8–14]. Like Spartan, MH protein is involved in the resistance to UV radiation and recruits the p97/TER94 segregase to stalled DNA replication forks in somatic cells. In the zygote, we found that the *mh* phenotype is consistent with perturbed or incomplete paternal DNA replication. Remarkably, however, the specific accumulation of MH in the male pronucleus before the first S phase suggests that this maternal protein is required to maintain paternal DNA integrity during nuclear decondensation or to set the paternal chromatin landscape in preparation of the first zygotic cycle.

Results and Discussion

Molecular Identification of the *maternal haploid* Gene

The original *mh*¹ allele (or *fs(1)1182*) was isolated in an ethyl methanesulfonate mutagenesis screen for X-linked female sterile mutations [15, 16]. Complementation analyses with newly available deficiencies [17] allowed us to reduce the *mh* genetic interval to a 33 kb region (13C3–13C5) with 12 predicted genes (Figure 1A). As *mh* is a strict maternal effect mutation, we focused on CG9203, a gene mainly expressed in adult ovary [18, 19] (Flybase). We mobilized a P element (*P*{*SUPor-P*}CG9203^{KG05829}) inserted in CG9203 to generate deletion alleles by imprecise excision. We isolated a female sterile mutation, *mh*², which did not complement the maternal

effect embryonic lethal phenotype of *mh*¹ (Table S1 available online). Molecular analysis of the *mh*² allele revealed the presence of a 903 bp deletion in CG9203. The deletion generated a premature STOP codon at the end of the second exon, leaving only 65 residues of the 724 aa predicted wild-type protein (Figure 1B). The identity of *mh* and CG9203 was finally confirmed by the rescue of *mh*² female sterility with a transgenic bacterial artificial chromosome (BAC) fragment containing the entire CG9203 gene and with a transgene expressing Maternal Haploid (MH) tagged in its N terminus with the V5 peptide (V5::MH; Figures 1A and 1B; Table S1).

Homozygous *mh*² females produced eggs in normal quantities (hereafter *mh*² eggs), but that failed to hatch (data not shown; Table S1). Hemizygous *mh*²/Y males were viable and fertile. Fertilization, pronuclear decondensation and apposition seemed to occur normally in *mh*² eggs (Figure 1C). However, in metaphase of the first zygotic mitosis, paternal chromosomes appeared improperly condensed and systematically formed a chromatin bridge in anaphase in a way identical to what we previously described for *mh*¹ eggs (Figures 1C and S1A) [7]. As for *mh*¹, most *mh*² embryos arrested their development after a few catastrophic mitoses, but about 20% escaped this early arrest and developed as nonviable gynogenetic haploid embryos after the loss of paternal chromosomes at the first mitosis (Figure 1D).

Interestingly, sequencing of the CG9203 coding region in *mh*¹ revealed the presence of five nonsynonymous substitutions (M151K, A368D, K372N, E381K, and K441T) compared to the reference genome sequence. The high evolutionary conservation of methionine 151 (see below) suggests that the M151K mutation is responsible for the *mh*¹ phenotype, while the other changes could be polymorphisms.

MH Specifically Accumulates in the Male Nucleus before the First Zygotic S Phase

Since maternal chromosomes in *mh* mutant eggs condense and divide normally, the *mh* phenotype cannot be explained by a general defect in mitotic chromosome condensation [7]. Several studies have established that perturbing DNA replication can lead to abnormal mitotic chromosome condensation and a chromatin bridge in mitosis [20–23]. To determine if the male pronucleus in *mh* eggs is capable of replicating its DNA, we attempted to incorporate the thymidine analog EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) during the first zygotic S phase. Feeding adult females with EdU allowed us to observe, on very rare occasions, its incorporation in DNA during the first zygotic S phase. In all four cases of *mh* cycle 1 embryos that had been exposed to the reagent, EdU had been clearly incorporated in both parental sets of chromosomes (Figure S1B). Although the rarity of these cases and the relative faintness of the staining did not allow us to reliably appreciate the level of EdU incorporation, this experiment nevertheless confirmed that paternal chromosomes at least initiate replication in *mh* eggs. We then tried to directly evaluate the phenotypic consequences of impeding DNA synthesis during the first zygotic replication. We chose to knock down the expression of the large catalytic subunit of DNA polymerase epsilon complex (*DNApol-ε*) by expressing a small hairpin RNA in the female germline [24].

²Present address: Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

*Correspondence: benjamin.loppin@univ-lyon1.fr

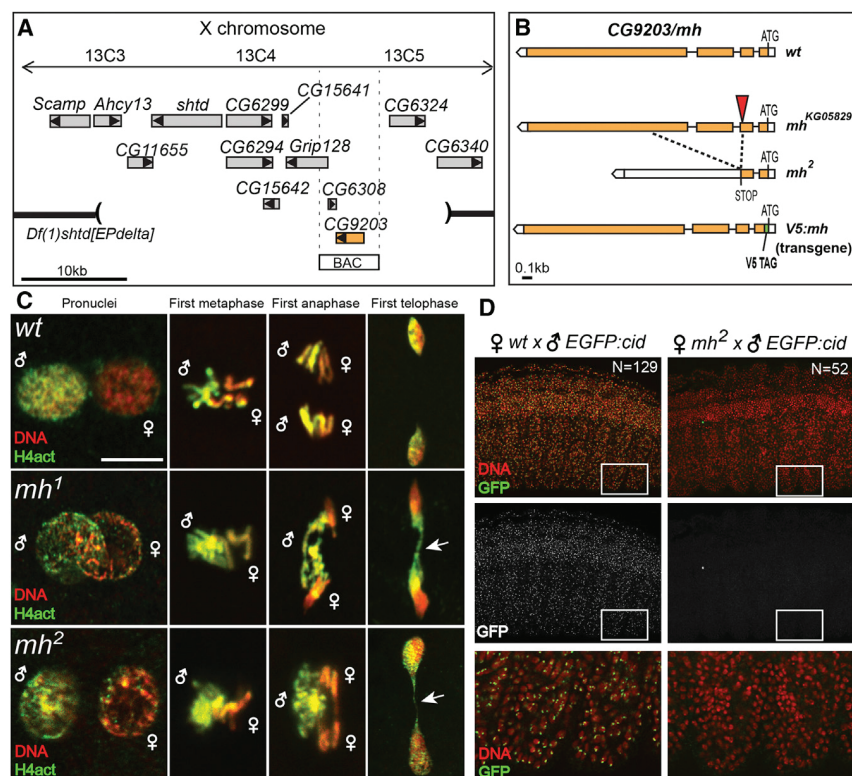


Figure 1. CG9203 Is the maternal haploid Gene

(A) The *mh* genetic region (X chromosome, 13C3–13C5) is defined by the noncomplementing deficiency *Df(1)shtd[EPdelta]* (interrupted thick black line). Annotated genes with their orientation are indicated, as well as the complementing transgenic BAC fragment.

(B) Mobilization of a P element (red triangle) inserted in the CG9203 gene (orange) generated a deletion (dashed lines) and a premature STOP codon in CG9203. The resulting female sterile mutant (*mh*²) does not complement *mh*¹ and is rescued by V5::mh transgenes (see also Table S1).

(C) Confocal images of pronuclei or zygotic chromosomes in eggs laid by females of the indicated genotypes. The acetylated histone H4 mark (H4act, green) is used as a marker of paternal chromatin during the first nuclear cycle. In eggs laid by homozygous *mh*¹ or *mh*² females, pronuclear formation and apposition occur normally (left). In metaphase of the first zygotic mitosis, paternal chromosomes in *mh*¹ and *mh*² eggs appear always improperly condensed and paternal sister chromatids fail to segregate during the first anaphase. Finally, in telophase, paternal chromatin forms a bridge (arrow) between the two daughter nuclei. For each genotype, at least 30 cycle 1 embryos were observed. Scale bar, 10 μ m

(D) Confocal images of segmented embryos laid by wild-type (left) or *mh*²/*mh*² (right) females mated with homozygous *P[w+, g-EGFP::cid]/III.2* transgenic males. In control diploid embryos, EGFP::CID (here detected with an anti-GFP anti-

body) is expressed from the paternally transmitted transgene and accumulates at centromeres. In *mh*² embryos, the absence of EGFP::CID indicates that paternal chromosomes have been lost. White boxes indicate the magnified regions. N is the number of embryos observed for each cross. See also Figure S1.

Strikingly, *DNApol-ε* knocked-down females produced embryos where both parental sets of chromosomes failed to condense normally in metaphase and systematically formed a chromatin bridge in anaphase, in a way similar to paternal chromosomes in *mh* mutant eggs (Figure S1A). Interestingly, in both cases, the dynamics of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in pronuclei appeared normal, again suggesting that DNA replication was not entirely disrupted (see Figures S3D). Taken together, these observations indicate that the *mh* phenotype is indeed compatible with a paternal DNA replication problem.

We then investigated the distribution of MH protein at fertilization. In *Drosophila*, eggs are fertilized shortly before deposition and male pronucleus formation occurs rapidly as female meiosis resumes. We generated a polyclonal antibody directed against two MH peptides. Remarkably, in wild-type eggs, the anti-MH antiserum specifically stained the decondensing male nucleus but not female chromosomes in meiosis II (Figure 2A). No staining was detected in the male nucleus in *mh*² eggs, thus demonstrating the specificity of the antibody and confirming that *mh*² is a null allele (Figure 2B). In contrast, the *mh*¹ mutation did not affect the localization of the protein (Figure 2B). Finally, in eggs from *mh*²; V5::mh females, we confirmed that V5::MH also specifically localized in the male nucleus using anti-V5 antibodies (Figure 2C). Importantly, the localization of MH or V5::MH in the male nucleus appeared very transient. MH was most abundant in the male nucleus of eggs in metaphase of female meiosis II but then rapidly vanished (Figure 2A). As metaphase of female meiosis II is the earliest stage we can practically observe, we do not know if MH localizes earlier in the male nucleus, notably when

protamine-like proteins are replaced with histones. Importantly, MH was no longer detected in the male nucleus at the onset of the first zygotic S phase, just before pronuclear apposition [25] (Figure 2D). Thus, although the improper condensation of paternal chromosomes in *mh* mutant zygotes is reminiscent of perturbed DNA replication, our results clearly show that MH is required in the male nucleus well before the first S phase, indicating that the observed phenotype is an indirect consequence of an earlier defect.

MH Is the *Drosophila* Ortholog of Human Spartan/DVC1

Blast analyses revealed that MH is highly conserved among metazoan (data not shown) and, recently, its human ortholog Spartan/C1orf124/DVC1 was characterized by several groups [8–14]. Like Spartan, MH is characterized by the presence of a large and remarkably conserved SprT domain [26] in its N terminus (Figure 3A). The domain spans 185 residues (111–296) including a stretch of 28 residues that are identical in human Spartan and that contain a predicted HEXxH catalytic motif found in zinc-dependent metalloproteases (Figure 3B) [26]. Searching protein databases identified only two human proteins with an SprT domain, Spartan and ACRC (Acidic-repeat containing protein), and four in *Drosophila melanogaster*, including MH. Thus, SprT-containing proteins seem relatively rare in animal proteomes.

Another key feature of Spartan/MH orthologs is the presence of at least one ubiquitin binding zinc finger (UBZ) [27] of the CCHC-type in its C terminus (Figures 3A and 3C). The association of the SprT domain with one or two UBZ domains is unique to Spartan orthologs, and on the basis of this criterion,

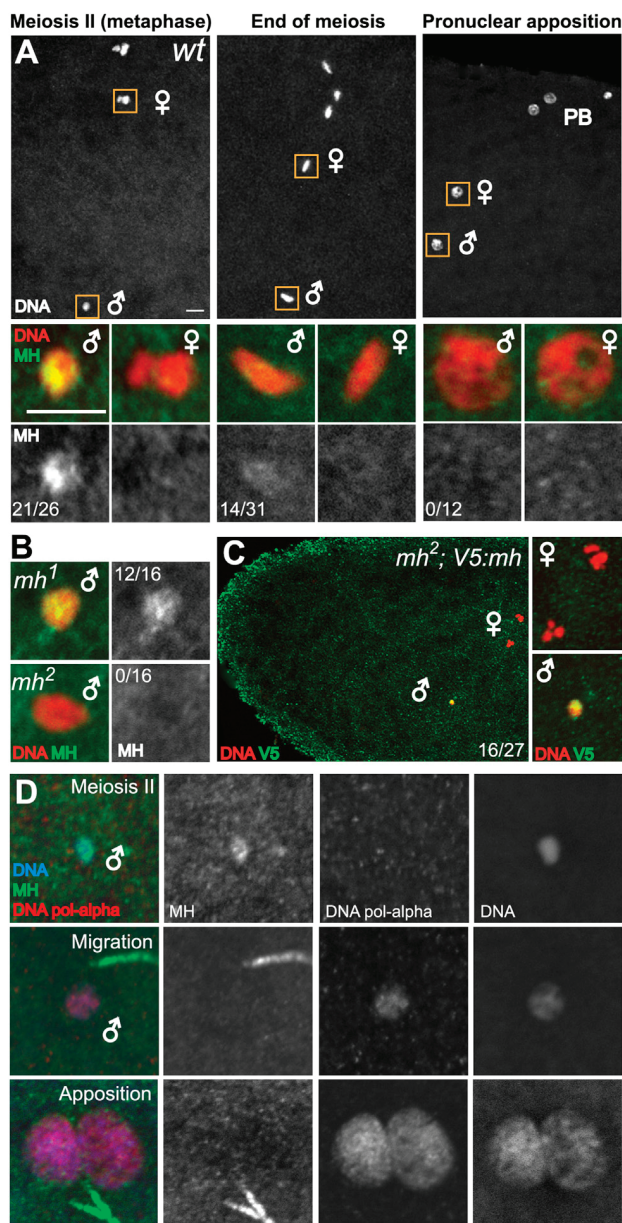


Figure 2. MH Specifically Accumulates in the Decondensing Male Nucleus before S Phase

(A) Confocal images of wild-type eggs at the indicated stage. The male and female pronuclei or chromosomes are identified with symbols. The MH protein is specifically detected in the male nucleus (left, inset) during metaphase of female meiosis II but not on maternal chromosomes. At the end of meiosis II (center), the anti-MH staining appears weak or absent. MH is not detected in migrating or apposed pronuclei (right). The number of male pronuclei positive for the anti-MH staining over the total number of observed pronuclei is indicated. PB, polar bodies. Scale bar, 10 μ m.

(B) During metaphase of female meiosis II, MH protein is detected in the male nucleus in eggs from *mh*¹ females. In eggs from *mh*² females at the same stage, the MH protein is not detected in the male nucleus.

(C) In eggs from *mh*²; *P[V5:V5:MH]62E* rescued females, the V5-tagged MH protein (detected with anti-V5 antibodies) specifically accumulates in the male nucleus (inset) during female meiosis II.

(D) In wild-type eggs, DNA polymerase α 180 is first detected in the male nucleus during pronuclear migration, after the disappearance of MH. The elongated structure in the green channel is the nonspecific staining of the sperm flagellum.

See also Figure S4.

a single Spartan/MH representative was found in most animal species (data not shown).

To investigate the functional contribution of these protein domains at fertilization, we generated a series of transgenes expressing various mutated versions of V5::MH under the control of its endogenous upstream sequences. All transgenes were inserted in the same *attP* landing platform in order to achieve similar expression levels (Figure S2). A control transgene expressing wild-type V5::MH fully rescued the fertility of *mh*² females (Figure 3A). In the ovaries of these females, V5::MH accumulated in nurse cell nuclei and in the germinal vesicle (the oocyte nucleus) from stage 10 egg chambers onward, thus reflecting the main germline expression of *mh* in adult females (Figure 3F). We then tested two independent transgenes with point mutations designed to inactivate the predicted HEMI domain of the SprT domain. Changing both histidine residues of the motif or the glutamic acid completely annihilated the ability of the transgenes to rescue *mh*² (Figure 3A). Unexpectedly however, we could not detect these mutated versions of V5::MH in ovaries despite a level of mRNA expression equivalent to the endogenous gene, suggesting that an intact peptidase motif is required for protein stability (Figure S2). Unfortunately, our failure to detect MH or V5::MH in a western blot assay using anti-MH or anti-V5 antibodies, respectively, prevented us from directly testing this possibility. The essential role of the SprT domain of MH is also supported by the presence of the M151K mutation in the original *mh*¹ allele. This residue lies upstream the HEMI catalytic motif within the SprT domain and is highly conserved in Spartan/MH orthologs (Figure 3B). These results indicate that the SprT domain and its putative proteolytic activity are essential for the function of MH. However, the role of this metalloprotease domain in the decondensing male nucleus remains elusive, as it is for its human ortholog in somatic cells.

In another series of transgenes, we mutated or deleted the predicted UBZ motifs of MH. Removing only the second UBZ (*V5:V5:MH*^{C699*} transgene) did not abolish the fertility of rescued females. However, inactivation of the first UBZ (*V5:V5:MH*^{C588F}) or deletion of both motifs (*V5:V5:MH* ^{Δ UBZ}) destabilized the protein and prevented *mh*² rescue (Figure 3A and Figure S2). Besides the SprT and UBZ domains, human Spartan contains a PCNA-interacting protein (PIP) box and a SHP motif required for the interaction with the VCP/p97 segregase [12, 14]. Both motifs seem to be conserved in MH although they do not perfectly match the consensus [28] (Figures 3C and 3D). However, deletion of the PIP (*V5:V5:MH* ^{Δ PIP}) or SHP (*V5:V5:MH* ^{Δ SHP}) reduced but did not abolish the fertility of rescued females, demonstrating that these motifs are not essential for the pronuclear function of MH.

Like Spartan, MH Is Involved in UV Resistance and Associates with PCNA in Somatic Cells

A recent series of papers collectively established that Spartan/DVC1 is a regulator of translesion synthesis (TLS) and is involved in the response to UV-induced DNA damage in human cells [8–14]. TLS is a mechanism of DNA damage tolerance in which the replacement of replicative polymerases with specialized TLS polymerases allows stalled replication forks to bypass certain types of DNA lesions [29, 30]. The finding that *mh* encoded a putative conserved regulator of TLS was unexpected when considering its highly specialized and replication-independent function in the male pronucleus. To explore the possibility that MH could play an additional role in TLS in somatic cells, we first tested the sensitivity of *mh*²

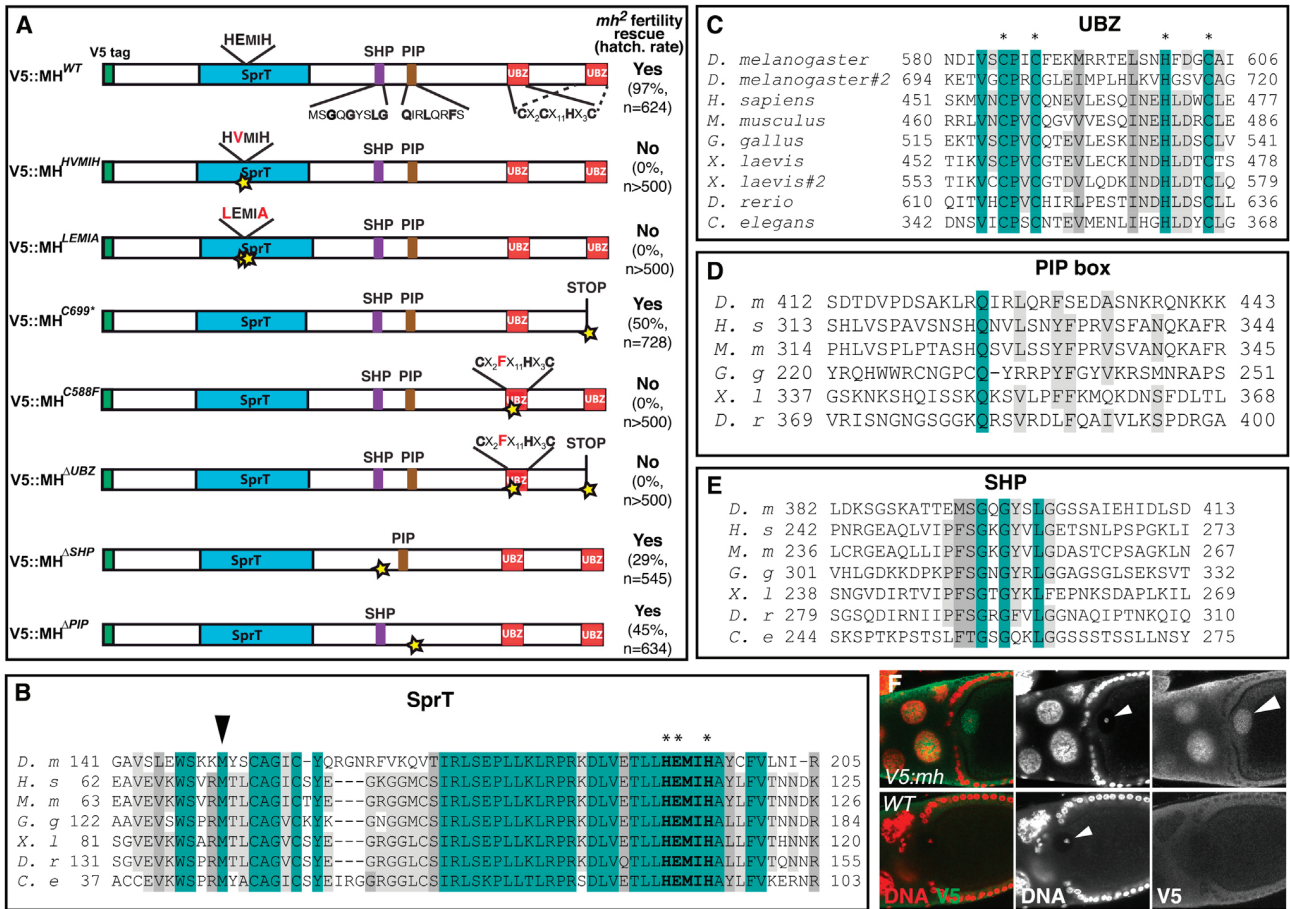


Figure 3. Conservation and Function of MH Protein Domains

(A) Schematic representation of wild-type and mutated versions of V5::MH proteins. Mutations are indicated with yellow stars. Transgenes were tested for their ability to rescue the fertility of *mh*² females. Embryo hatching rates obtained from *mh*² females homozygous for the corresponding transgene are indicated (n is the total number of embryos).

(B) Alignment of SprT domains from various MH orthologs. Residues that are conserved in all species are highlighted in green. Those that belong to the same class of amino acids in all species are highlighted in dark gray. Residues of the same class that are not present in all species are in light gray. The HExxH motif is indicated with asterisks. The black arrowhead points to the conserved methionine 151 changed in the *mh*¹ allele (M151K).

(C) Alignment of UBZ domains. Note that MH and its *Xenopus laevis* ortholog harbor two UBZ domains. The CCHC motif is indicated with asterisks.

(D) Alignment of PIP boxes.

(E) Alignment of SHP motifs.

(F) Top: distribution of V5::MH in a stage 10 egg chamber. The anti-V5 antibody detects V5::MH in nurse cell nuclei and in the oocyte nucleus. The karyosome is indicated (arrowheads). Bottom: the anti-V5 antibody does not stain germline nuclei in nontransgenic egg chambers.

See also Figure S2.

mutant larvae to UV radiation. Strikingly, *mh*² third instar larvae displayed the same sensitivity to UV light than larvae deficient for the TLS polymerase DNA pol-eta [31] (Figure 4A). Importantly, the UV resistance of *mh*² larvae was fully restored by two copies of the *V5::mh* transgene, thus confirming the specific implication of MH in this resistance.

In human cells, Spartan is almost systematically found associated with the replication factor PCNA, which is also a key regulator of the polymerase switch at the site of DNA lesions during TLS [32]. Spartan and PCNA hence colocalize in multiple nuclear foci that correspond to stalled DNA replication forks. To test the intrinsic ability of MH to associate with PCNA in somatic cells, we took advantage of salivary gland polytene chromosomes that naturally accumulate PCNA at stalled replication forks [33]. In wild-type third instar larvae, we observed PCNA accumulated in randomly

distributed foci that usually did not span the entire width of polytene chromosomes (Figure 4B and S3C). As *mh* is not expressed in salivary glands (Flybase), we generated transgenic lines expressing V5::MH under the control of the inducible UAS/Gal4 system. Strikingly, induction of the *UAS-V5::mh* transgene in salivary gland led to a near perfect colocalization of V5::MH with PCNA foci (Figure 4B). V5::MH foci were indistinguishably detected using anti-MH or anti-V5 antibodies (Figures S3B and 4C). We conclude that MH is indeed capable of accumulating with PCNA at stalled replication forks, thus sharing this property with its human ortholog. The precise role of Spartan at DNA replication blocks is, however, not entirely clear. Several studies have proposed that Spartan regulates TLS by enhancing Rad18-dependent PCNA ubiquitination [8, 10] or by stabilizing ubiquitinated PCNA and RAD18 at DNA damage sites [9, 14]. The apparent absence

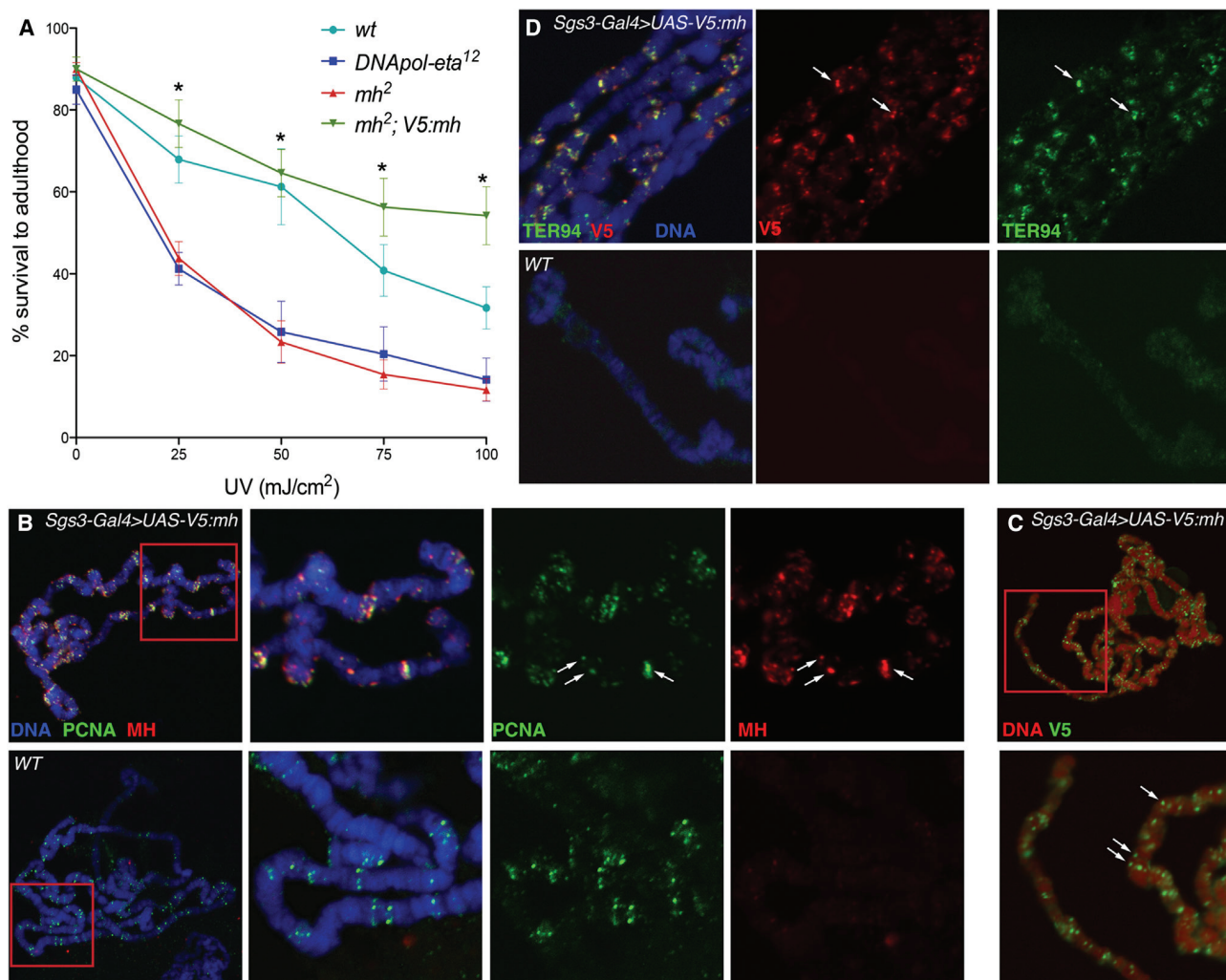


Figure 4. MH Is Involved in UV Resistance in Somatic Cells

(A) *mh²* mutant larvae are sensitive to UV radiation. Third instar larvae of the indicated genotype were exposed to 0, 25, 50, 75, or 100 mJ/cm² (254 nm), and survival rates to adulthood were subsequently determined. Error bars represent the standard error of the mean of six independent experiments. (Asterisks: wild-type versus *mh²* $p < 0.05$, Mann-Whitney $n = 6$.)

(B) PCNA accumulates into discrete foci (arrows) on salivary gland polytene chromosomes. Top: when overexpressed in salivary glands with the *Sgs3-Gal4* driver, V5::MH (here detected with the anti-MH antibody) colocalizes with PCNA (arrows). Bottom: note that endogenous MH is not detected on polytene chromosomes of wild-type larvae. Red squares indicate the magnified regions.

(C) Immunofluorescence of overexpressed V5::MH on polytene chromosomes using the anti-V5 antibody. V5::MH foci (arrows) are clearly visible. Red square indicates the magnified region.

(D) Top: overexpression of V5::MH in salivary glands recruits the p97 homolog TER94 to V5::MH foci (arrows). Bottom: in wild-type salivary glands, TER94 is barely detected on chromosomes.

See also Figure S3.

of a RAD18 homolog in *Drosophila* prevented us to test this possibility. Two other groups have alternatively proposed that Spartan could be involved in the recruitment of the p97/VCP segregase to replication blocks to limit the extent of TLS by extracting TLS polymerases [12, 13]. The molecular chaperone p97/VCP is a conserved AAA-ATPase (ATPase associated with diverse cellular activities) represented in *Drosophila* by the ubiquitously expressed TER94 protein [34]. Immunofluorescence of salivary glands with anti-p97/VCP antibody (that recognizes TER94 [35]) barely stained squashed polytene chromosomes. Surprisingly however, we observed the accumulation of TER94 at MH foci when V5::MH was expressed in salivary glands (Figure 4D). These

results demonstrate that MH is indeed capable of recruiting TER94 at stalled forks, thus strongly supporting the same property for Spartan/DVC1 in human cells. However, despite the functional conservation of MH and Spartan in somatic cells, neither PCNA nor TER94 were detected in the decondensing male nucleus (Figures S3D and S3E), thus reinforcing the idea that MH functions differently in the egg and in larval somatic cells. In addition, the fertility of *DNAPol-eta¹²* mutant females ([31] and our own observations) argues against a specific implication of TLS per se in the male pronucleus.

Finally, during the course of this study, we discovered that the DNA damage marker γ H2A.Z (histone H2A.Z [36] phosphorylated at serine 137) specifically accumulated as

nuclear foci in the decondensing male nucleus, in a way similar to the asymmetric distribution of γ H2A.X foci in the male pronucleus of mouse zygotes [37, 38]. However, the dynamic distribution of these paternal γ H2A.Z foci did not seem altered in *mh* mutant eggs (Figure S4), suggesting that MH function is at least not directly related to the presence of these marks, although this does not rule out that these putative paternal DNA damage could persist in mutant eggs.

Conclusions

Although MH shares with Spartan a somatic role in UV resistance, the essential replication-independent function of this metalloprotease in the male pronucleus is not consistent with canonical TLS. We instead favor a role of MH specifically related to the unique chromatin or topological features of sperm DNA. Although *mh* does not perturb global paternal chromatin assembly triggered by the eviction of sperm protamines [7], it is possible that yet unknown sperm nuclear proteins require MH for their timely proteolysis at fertilization, in preparation of the first S phase. Alternatively, the recently formulated hypothesis that Spartan could repair DNA-protein crosslinks, such as those involving topoisomerases [39], is particularly stimulating as these enzymes are involved in sperm DNA topological rearrangements at the histone-to-protamine transition [40, 41]. Finally, as *Drosophila* and humans share a protamine-based organization of sperm chromatin, future work will have to determine if Spartan/DVC1 is similarly required in mammals to preserve the integrity of paternal chromosomes at the onset of embryogenesis.

Supplemental Information

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, four figures, and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.010>.

Acknowledgments

We thank Mitch McVey, Agnès Audibert, Beat Suter, Kim McKim, Stefan Heidmann, and Kazukumi Kuroda and the Bloomington Stock Center for *Drosophila* stocks and antibodies. We thank the TRiP at Harvard Medical School (NIH/NIGMS R01-GM084947) for providing the transgenic RNAi fly stock used in this study. We thank Patrick Lomonte for his help with UV radiations and Terry Orr-Weaver for her suggestions regarding the EdU feeding procedure. We also thank Alain Debec, Timothy Megraw, Anne Laurençon, Valérie Robert, and Francesca Palladino for helpful discussions. We thank Raphaëlle Dubruille, Samantha Tirmarche, and Shuhei Kimura for critical reading of the manuscript. We are grateful to Jérôme Schmitt, Patricia Morales, and Elisabeth Cortier for maintenance of *Drosophila* stocks. Confocal microscopy was performed with the help of the Centre Technologique des Microstructures. This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ZygoPat—ANR-12-BSV6-0014). L.D. is supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Received: March 7, 2014

Revised: July 5, 2014

Accepted: August 6, 2014

Published: September 18, 2014

References

- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8, 227.
- Lewis, J.D., Song, Y., de Jong, M.E., Bagha, S.M., and Ausiò, J. (2003). A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 111, 473–482.
- Barratt, C.L.R., Aitken, R.J., Björndahl, L., Carrell, D.T., de Boer, P., Kvist, U., Lewis, S.E.M., Perreault, S.D., Perry, M.J., Ramos, L., et al. (2010). Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications—a position report. *Hum. Reprod.* 25, 824–838.
- Generoso, W.M., Cain, K.T., Krishna, M., and Huff, S.W. (1979). Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 435–437.
- Derijck, A.A.H.A., van der Heijden, G.W., Giele, M., Philippens, M.E.P., van Bavel, C.C.A.W., and de Boer, P. (2006). gammaH2AX signalling during sperm chromatin remodelling in the mouse zygote. *DNA Repair (Amst.)* 5, 959–971.
- Derijck, A., van der Heijden, G., Giele, M., Philippens, M., and de Boer, P. (2008). DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1922–1937.
- Loppin, B., Berger, F., and Couble, P. (2001). Paternal chromosome incorporation into the zygote nucleus is controlled by maternal haploid in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 231, 383–396.
- Centore, R.C., Yazinski, S.A., Tse, A., and Zou, L. (2012). Spartan/C1orf124, a reader of PCNA ubiquitylation and a regulator of UV-induced DNA damage response. *Mol. Cell* 46, 625–635.
- Machida, Y., Kim, M.S., and Machida, Y.J. (2012). Spartan/C1orf124 is important to prevent UV-induced mutagenesis. *Cell Cycle* 11, 3395–3402.
- Juhasz, S., Balogh, D., Hajdu, I., Burkovics, P., Villamil, M.A., Zhuang, Z., and Haracska, L. (2012). Characterization of human Spartan/C1orf124, an ubiquitin-PCNA interacting regulator of DNA damage tolerance. *Nucleic Acids Res.* 40, 10795–10808.
- Kim, M.S., Machida, Y., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., Pang, Y.-P., and Machida, Y.J. (2013). Regulation of error-prone translesion synthesis by Spartan/C1orf124. *Nucleic Acids Res.* 41, 1661–1668.
- Mosbech, A., Gibbs-Seymour, I., Kagias, K., Thorslund, T., Beli, P., Povlsen, L., Nielsen, S.V., Smedegaard, S., Sedgwick, G., Lukas, C., et al. (2012). DVC1 (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1084–1092.
- Davis, E.J., Lachaud, C., Appleton, P., Macartney, T.J., Näthke, I., and Rouse, J. (2012). DVC1 (C1orf124) recruits the p97 protein segregase to sites of DNA damage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1093–1100.
- Ghosal, G., Leung, J.W.C., Nair, B.C., Fong, K.W., and Chen, J. (2012). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding protein C1orf124 is a regulator of translesion synthesis. *J. Biol. Chem.* 287, 34225–34233.
- Gans, M., Audit, C., and Masson, M. (1975). Isolation and characterization of sex-linked female-sterile mutants in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 81, 683–704.
- Zalokar, M., Audit, C., and Erk, I. (1975). Developmental defects of female-sterile mutants of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 47, 419–432.
- Tanaka-Matakatsumi, M., Thomas, B.J., and Du, W. (2007). Mutation of the Apc1 homologue shattered disrupts normal eye development by disrupting G1 cell cycle arrest and progression through mitosis. *Dev. Biol.* 309, 222–235.
- Graveley, B.R., Brooks, A.N., Carlson, J.W., Duff, M.O., Landolin, J.M., Yang, L., Artieri, C.G., van Baren, M.J., Boley, N., Booth, B.W., et al. (2011). The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 471, 473–479.
- Robinson, S.W., Herzyk, P., Dow, J.A.T., and Leader, D.P. (2013). FlyAtlas: database of gene expression in the tissues of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 41, D744–D750.
- Fasulo, B., Koyama, C., Yu, K.R., Homola, E.M., Hsieh, T.S., Campbell, S.D., and Sullivan, W. (2012). Chk1 and Wee1 kinases coordinate DNA replication, chromosome condensation, and anaphase entry. *Mol. Biol. Cell* 23, 1047–1057.
- Balasov, M., Huijbregts, R.P.H., and Chesnokov, I. (2009). Functional analysis of an Orc6 mutant in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 10672–10677.
- Pflumm, M.F., and Botchan, M.R. (2001). Orc mutants arrest in metaphase with abnormally condensed chromosomes. *Development* 128, 1697–1707.
- Loupart, M.L., Krause, S.A., and Heck, M.S. (2000). Aberrant replication timing induces defective chromosome condensation in *Drosophila* ORC2 mutants. *Curr. Biol.* 10, 1547–1556.

24. Ni, J.-Q., Zhou, R., Czech, B., Liu, L.-P., Holderbaum, L., Yang-Zhou, D., Shim, H.-S., Tao, R., Handler, D., Karpowicz, P., et al. (2011). A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nat. Methods* 8, 405–407.
25. Loppin, B., Berger, F., and Couble, P. (2001). The *Drosophila* maternal gene *sésame* is required for sperm chromatin remodeling at fertilization. *Chromosoma* 110, 430–440.
26. Ponting, C.P. (2002). Novel domains and orthologues of eukaryotic transcription elongation factors. *Nucleic Acids Res.* 30, 3643–3652.
27. Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K.J. (2009). Ubiquitin-binding domains—from structures to functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 659–671.
28. Maga, G., and Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* 116, 3051–3060.
29. Friedberg, E.C. (2005). Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 943–953.
30. Ghosal, G., and Chen, J. (2013). DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Transl. Cancer Res.* 2, 107–129.
31. Kane, D.P., Shusterman, M., Rong, Y., and McVey, M. (2012). Competition between replicative and translesion polymerases during homologous recombination repair in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 8, e1002659.
32. Mailand, N., Gibbs-Seymour, I., and Bekker-Jensen, S. (2013). Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 269–282.
33. Kolesnikova, T.D., Posukh, O.V., Andreyeva, E.N., Bebyakina, D.S., Ivankin, A.V., and Zhimulev, I.F. (2013). *Drosophila* SUUR protein associates with PCNA and binds chromatin in a cell cycle-dependent manner. *Chromosoma* 122, 55–66.
34. Pintér, M., Jékely, G., Szepesi, R.J., Farkas, A., Theopold, U., Meyer, H.E., Lindholm, D., Nässel, D.R., Hultmark, D., and Friedrich, P. (1998). TER94, a *Drosophila* homolog of the membrane fusion protein CDC48/p97, is accumulated in nonproliferating cells: in the reproductive organs and in the brain of the imago. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 91–98.
35. Chang, Y.-C., Hung, W.-T., Chang, Y.-C., Chang, H.C., Wu, C.-L., Chiang, A.-S., Jackson, G.R., and Sang, T.-K. (2011). Pathogenic VCP/TER94 alleles are dominant actives and contribute to neurodegeneration by altering cellular ATP level in a *Drosophila* IBMPFD model. *PLoS Genet.* 7, e1001288.
36. Talbert, P.B., Ahmad, K., Almouzni, G., Ausió, J., Berger, F., Bhalla, P.L., Bonner, W.M., Cande, W.Z., Chadwick, B.P., Chan, S.W.L., et al. (2012). A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenet. Chromatin* 5, 7.
37. Wossidlo, M., Arand, J., Sebastiano, V., Lepikhov, K., Boiani, M., Reinhardt, R., Schöler, H., and Walter, J. (2010). Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *EMBO J.* 29, 1877–1888.
38. Ziegler-Birling, C., Helmrich, A., Tora, L., and Torres-Padilla, M.-E. (2009). Distribution of p53 binding protein 1 (53BP1) and phosphorylated H2A.X during mouse preimplantation development in the absence of DNA damage. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 1003–1011.
39. Stingle, J., Schwarz, M.S., Bloemeke, N., Wolf, P.G., and Jentsch, S. (2014). A DNA-Dependent Protease Involved in DNA-Protein Crosslink Repair. *Cell* 158, 327–338.
40. Roca, J., and Mezquita, C. (1989). DNA topoisomerase II activity in non-replicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids. *EMBO J.* 8, 1855–1860.
41. Laberge, R.M., and Boissonneault, G. (2005). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol. Reprod.* 73, 289–296.

Current Biology, Volume 24

Supplemental Information

**The Spartan Ortholog Maternal Haploid
Is Required for Paternal Chromosome
Integrity in the *Drosophila* Zygote**

Laetitia Delabaere, Guillermo A. Orsi, Laure Sapey-Triomphe, Béatrice Horard, Pierre Couble, and Benjamin Loppin

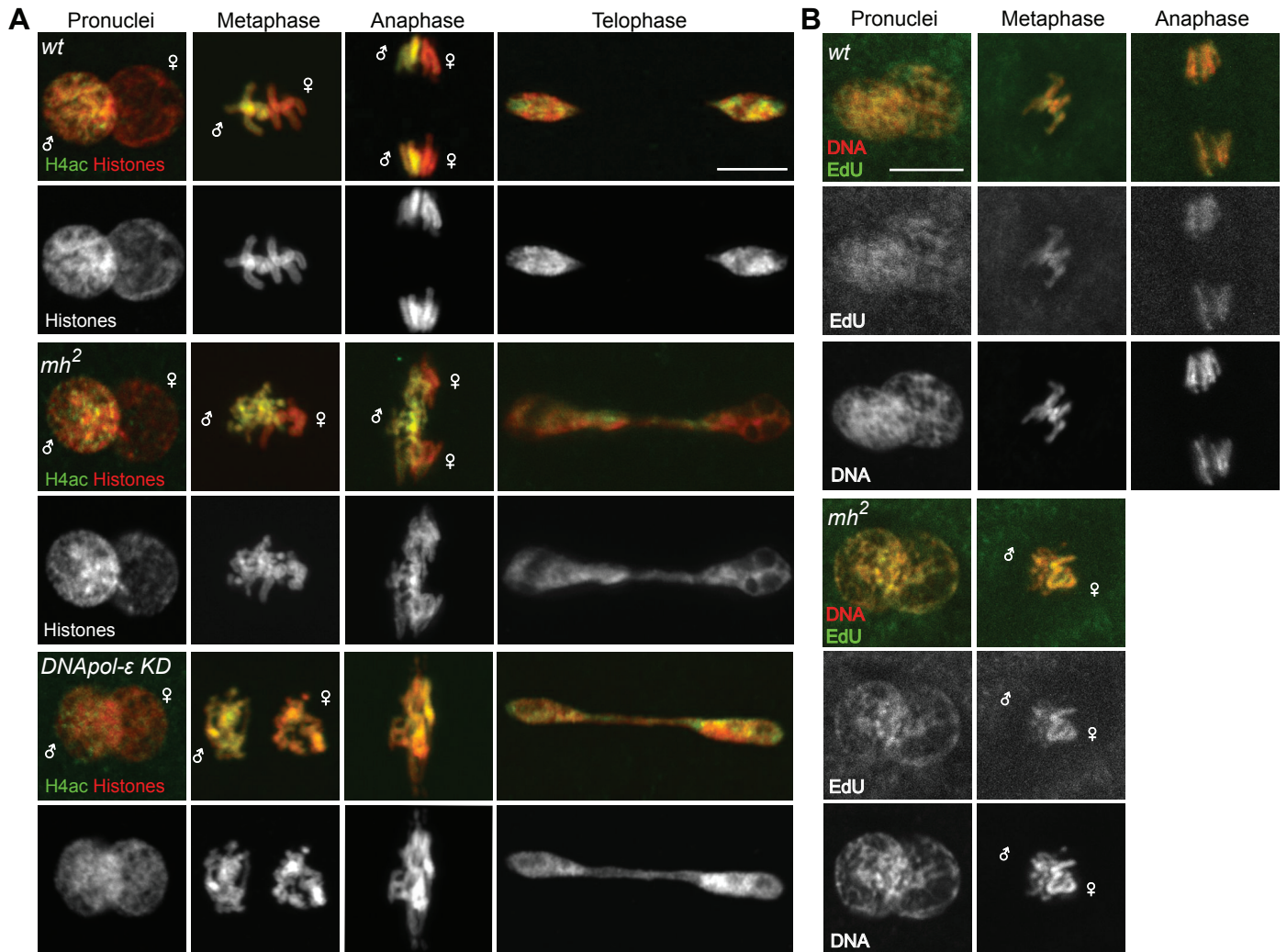


Figure S1 (Related to Figure 1) – Comparison of *mh²* and *DNAPol ε* KD phenotypes and EdU labeling of cycle 1 embryos

Confocal images of pronuclei or zygotic chromosomes in eggs laid by females of the indicated genotypes.

(A) Eggs were stained with anti-acetylated Histone H4 (H4act, green) and anti-Histones (Histones, red) antibodies. In eggs laid by *mh²* females, paternal chromosomes appear improperly condensed compared to maternal chromosomes and to *wild-type* paternal chromosomes. *DNAPol-ε* KD females (*y v/w; UAS-shRNA DNAPol-ε/P{GAL4::VP16-nos.UTR} CG6325^{MVD1}*) were almost completely sterile (Embryo hatching rate: 1.3% ; N=699). In eggs laid by *DNAPol-ε* KD females, both parental sets of chromosomes show a condensation defect at metaphase and a chromatin bridge is observed in anaphase and telophase. At least 12 cycle 1 embryos at the indicated stage were observed.

(B) EdU labeling experiments. Eggs were obtained by feeding females with EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine). In rare *wild-type* (n=3) or *mh²* (n=4) cycle 1 embryos that were labelled, EdU was detected in both sets of chromosomes. Note that EdU was never detected on maternal chromosomes during meiosis (n=25 ; not shown).

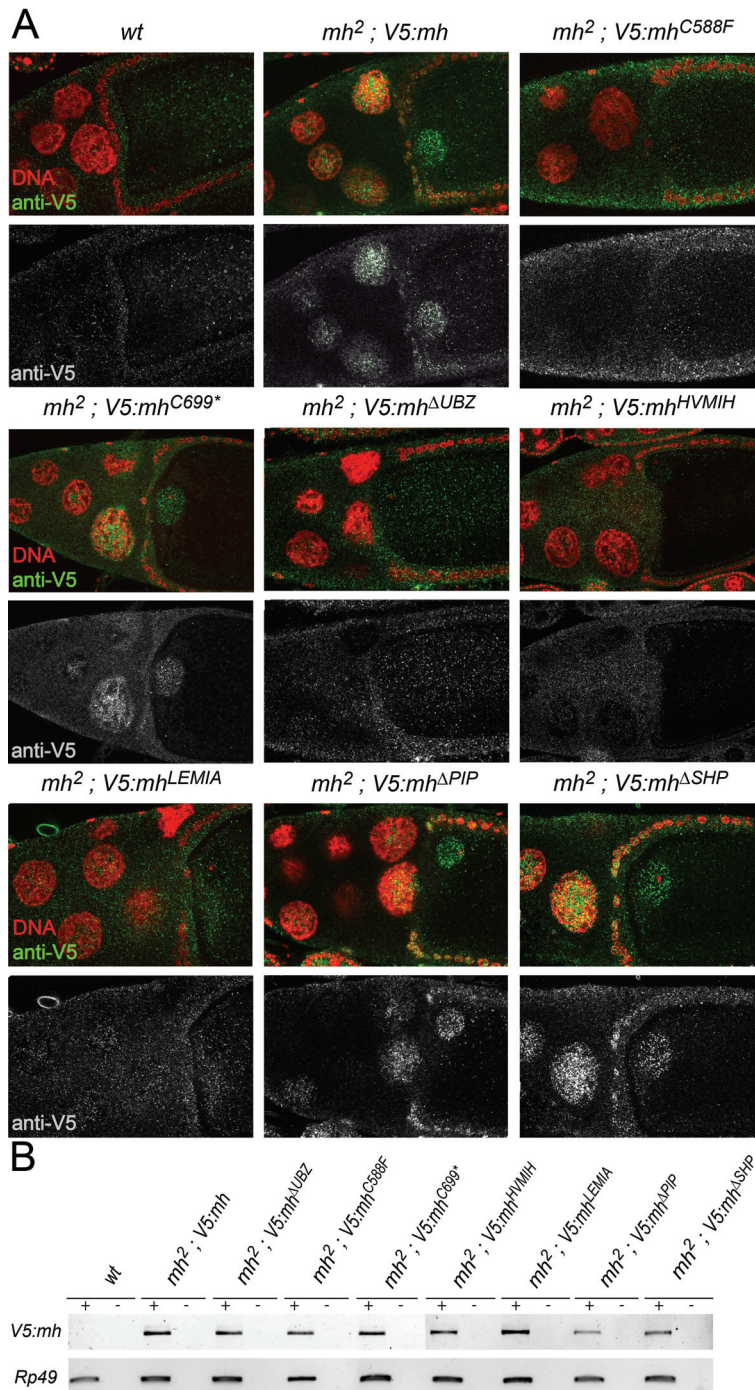


Figure S2 (Related to Figure 3) - Expression of V5:*mh* transgenes in the female germline

(A) Confocal images of stage 10 egg chambers dissected from females homozygous for the *mh*² mutation and for the indicated transgene (transgenes are described in Figure 3). In egg chambers expressing the *wild-type* version of V5:*mh*, the tagged protein is detected in oocyte and nurse cell nuclei. In egg chambers from *mh*²; V5:*mh*^{C699*}, *mh*²; V5:*mh*^{ΔPIP} and *mh*²; V5:*mh*^{ΔSHP} females, V5::MH proteins localize as in control ovaries. In egg chambers from *mh*²; V5:*mh*^{C588F}, *mh*²; V5:*mh*^{ΔUBZ}, *mh*²; V5:*mh*^{HVMIH}, *mh*²; V5:*mh*^{LEMIA}, V5::MH mutant proteins were not detected.

(B) Semi-quantitative RT-PCR analysis of V5:*mh* transgene expression in ovaries from the indicated genotypes. The same RNA samples were analyzed for *Rp49* expression as a control.

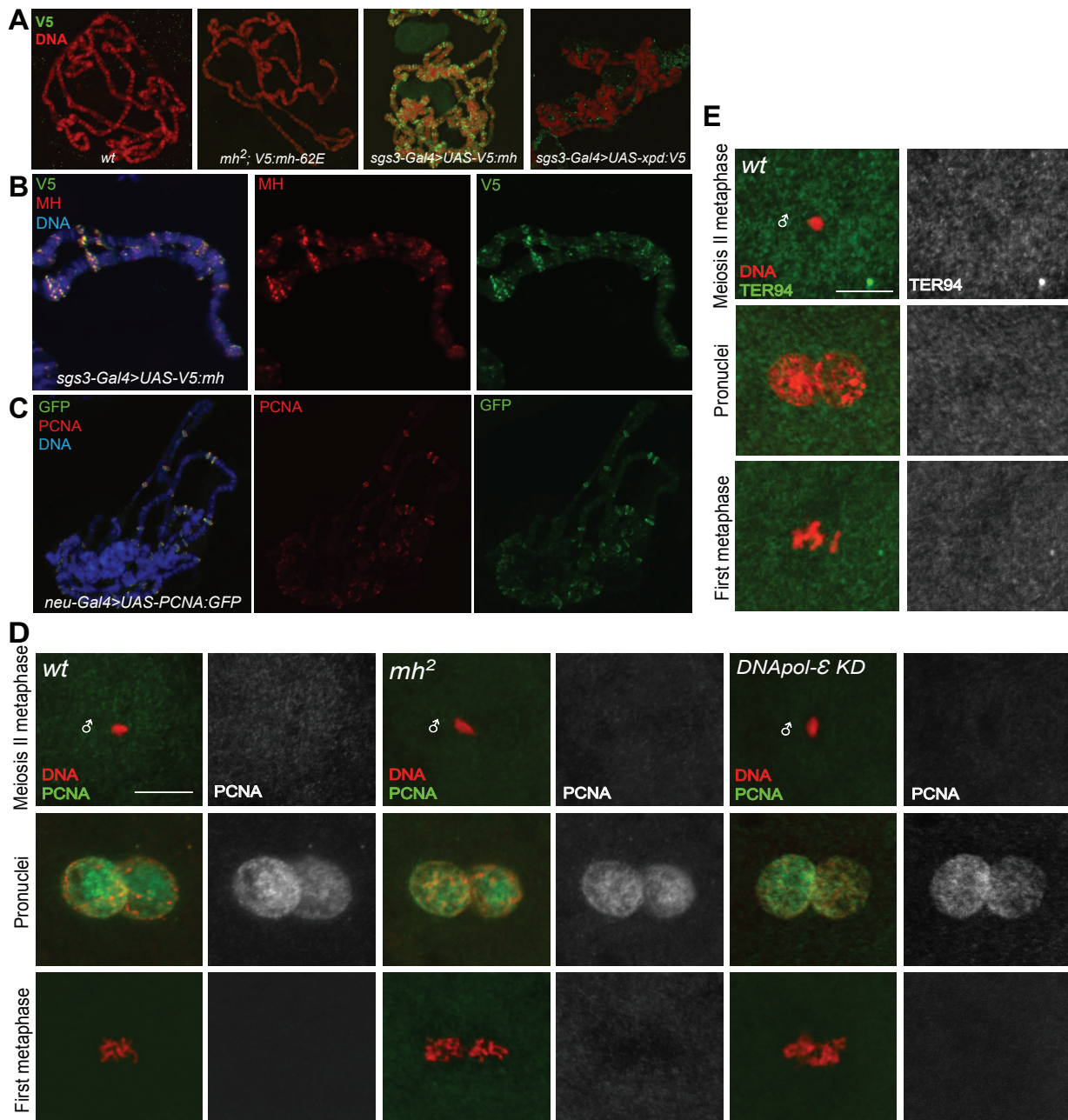


Figure S3 (Related to Figure 4) – Additional PCNA and TER94 control stainings on polytene chromosomes and in eggs

Confocal images of squashed polytene chromosomes of the indicated genotype (A, B and C).

(A) The anti-V5 antibody only stains chromosomes from salivary glands overexpressing V5::MH. V5 foci are not detected on chromosomes from *wild-type*, *mh2; V5:mh-62E* and *sgs3-Gal4>UAS-xpd:V5*.

(B) Anti-MH and anti-V5 antibodies stain the same discrete foci on polytene chromosomes from salivary glands overexpressing V5::MH, thus demonstrating the specificity of the anti-MH staining in this context.

(C) Anti-PCNA antibody stains PCNA::GFP expressed in salivary glands.

Confocal images of eggs laid by females of the indicated genotypes (D,E).

(D) At fertilization and during zygote formation, PCNA is only detected in replicating pronuclei at the apposition stage in all genotypes. *DNApol-ε KD* females are described in Figure S1.

(E) TER94 does not show any nuclear staining in eggs or cycle 1 zygotes.

Bar: 10μm.

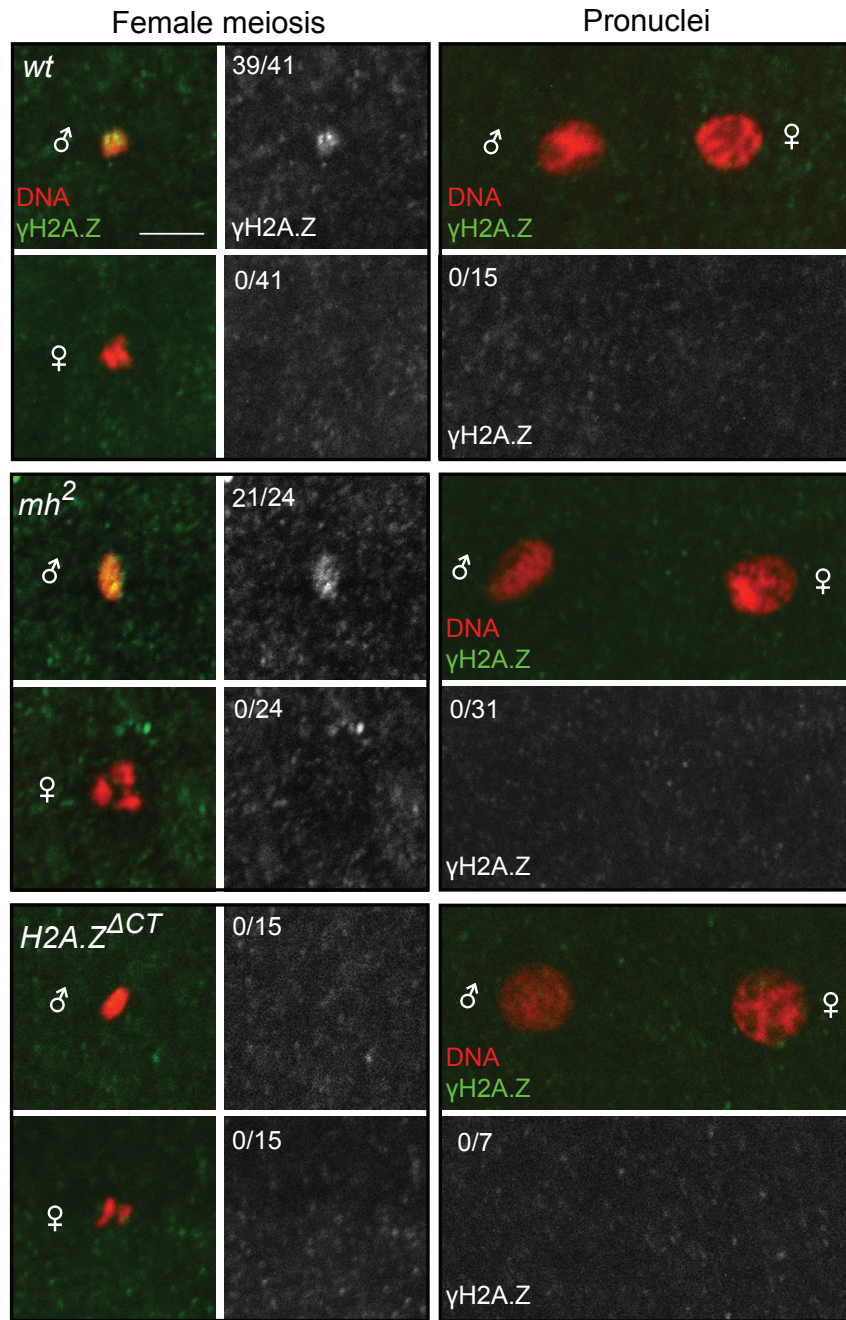


Figure S4 (related to Figure 2) - γ H2A.Z is specifically detected in the male nucleus in wild-type and *mh* eggs

Confocal images of eggs laid by females of the indicated genotypes.

Top - In *wild-type* eggs, γ H2A.Z foci are specifically detected in the decondensing male nucleus during female meiosis. No staining is detected in the female nucleus at the same stage or in decondensed pronuclei.

Center- γ H2A.Z foci are detected in the male nucleus in eggs laid by *mh²* females as in *wild-type* eggs.

Bottom - γ H2A.Z foci are not detected in eggs laid by *H2A.Z^{ΔCT}* females (*P{His2Av^{ΔCT}}XC, w ; I(3)His2Av⁸¹⁰*). These females only express a mutant form of H2A.Z which lacks serine 137. The number of positive nuclei over the total number of observed eggs is indicated for each panel.

Bar: 10 μ m.

Table S1 – Complementation analysis and rescue of *mh* alleles

Genotypes of females	Hatch. rate (%)	N
<i>w</i>	95	599
<i>y w fs(1)RK4 mh¹</i>	0	>500
<i>y w fs(1)RK4 mh¹ /w</i>	98	721
<i>y w fs(1)RK4 mh¹ /Df(1)shtd[EPdelta]</i>	0	888
<i>y w fs(1)RK4 mh¹ / w mh²</i>	0	>500
<i>y mh^{KG05829}</i>	90	692
<i>w mh²</i>	0	>500
<i>w mh²/w</i>	96	987
<i>w mh²; p[Bac-CG9203]62E /+</i>	77	502
<i>y w fs(1)RK4 mh¹/w mh²; p[V5:mh]62E /+</i>	80	531
<i>w mh²; p[V5:mh]II</i>	84	647
<i>w mh²; p[V5:mh]II/+</i>	92	769
<i>w mh²; p[V5:mh]62E</i>	97	624
<i>w mh²; p[V5:mh]62E/+</i>	73	858
<i>y w fs(1)RK4 mh¹; p[V5:mh]62E</i>	0	>500
<i>w mh²; UASP-V5:mh-II/+;</i> <i>P{GAL4::VP16nos.UTR}CG6325^{MVD1}/+</i>	69	446

Virgin females of the indicated genotypes were crossed with *w¹¹¹⁸/Y* males and embryo hatching rates were determined as described in the Supplemental Experimental Procedures section. *fs(1)RK4* is an other female sterile mutation on the original *mh¹* chromosome which does not complemente the *Df(1)RK4* deficiency [S1]. As expected, the *p[V5:mh]62E* transgene could not rescue the fertility of *mh¹* homozygous females because of the presence of *fs(1)RK4* on the *mh¹* chromosome. N is the total number of eggs examined for each genotype.

Supplemental Experimental Procedures

Drosophila stocks

Flies were raised at 25°C on standard medium. The *w¹¹¹⁸* stock was used as *wild-type* control in all experiments. All stocks were obtained from the Bloomington *Drosophila* stock center unless otherwise noted. The *y w fs(1)RK4 mh¹/FM7c* stock was previously described [S1]. The *P{SUPor-P}CG9203^{KG05829}* element was remobilized with the *CyO, H{w[+mC]=PDelta2-3}HoP2.1* chromosome. We also used the following stocks: *UAS-Xpd:V5* [S2], *DNApol-eta¹²* [S3], *UAS-PCNA:GFP, neuralized^{p72}-Gal4* [S4, S5], *P[w+, g-EGFP:cid]III.2* [S6], and *P{His2Av^{ΔCT}}XC, w ; l(3)His2Av⁸¹⁰ (H2A.Z^{ΔCT})* [S7].

The *pW8[V5:mh]II* and *pUASP-V5:mh* transgenic lines were obtained by standard *P*-mediated germline transformation. All the other transgenes were integrated in the *PBAc{y[+]-attP-3B}VK00031* platform (62E1) using the *phiC-31* integrase method [S8].

Antibodies

We used the following primary antibodies at the indicated dilutions for immunofluorescence experiments: rabbit polyclonal anti-acetylated histone H4 (06-598, Upstate; 1:200), mouse monoclonal anti-PCNA (PC10, Abcam; 1:1000), mouse monoclonal anti-DNA polymerase α (clone 1B10; 1:500) [S9], mouse monoclonal anti-V5 antibody (R960-25, Invitrogen; 1:500), mouse monoclonal anti-GFP antibody (118144600001, Roche; 1:250), rabbit polyclonal anti-Histone H2AvD (H2A.Z) pS137 (600-401-914, Rockland; 1:1000), mouse monoclonal anti-Histones (MABE71, Millipore; 1:1500). The rabbit polyclonal anti-VCP/p97 antibody (2648, Cell Signaling; 1:100) has been previously used to detect *Drosophila* TER94 [S10]. The rabbit polyclonal anti-MH antibody was generated by immunizing a rabbit with a mixture of two MH synthetic peptides (MH-1: 31-NDRDYQLARRIQN-43 ; MH-2: 678-SEDELTPRQRRQRN-691). Crude antisera were used at a 1:500 dilution in immunofluorescence. Alexa Fluor (Molecular Probes) or DyLight (Jackson ImmunoResearch) conjugated fluorescent secondary antibodies were used at a 1:300 dilution for polytene chromosome staining or 1:1000 dilution for other experiments.

Plasmid constructs

pUASP-Bac-CG9203: The *Drosophila melanogaster* BAC genomic clone CH322-124H21 [S11] was obtained from the Children's Hospital Oakland Research Institute, California, USA. A 5146 bp fragment containing the entire *mh* coding sequence with 1192bp upstream the start codon and 1541bp kb downstream the stop codon was excised with the *XbaI* and *AgeI* restriction enzymes and subcloned into the *pUASP-attB* transgenesis vector [S12].

pW8-V5:mh* and *pW8-attB-V5:mh: These constructs have been assembled through the sequential insertion in the *pW8* and *pW8-attB* [S12] plasmids of three DNA fragments: a 1974bp fragment covering the *mh* upstream regulatory sequences and a 149bp fragment containing the V5 tag sequence fused in frame to the *mh* coding sequence using, respectively, the EcoRI-promMH5' and promMH3'-ATG-EcoRI primers, and the EcoRI-V5-MH and MH-SacII primers; and a 2341bp genomic fragment covering the rest of the *mh* coding sequence and 1531bp downstream of the stop codon that was excised from the CH322-124H21 BAC using *SacII* and *XbaI* restriction enzymes. To obtain the mutated versions of *pW8-attB-V5:mh*, site-directed mutageneses were performed with the QuikChange®II XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) with the primer pairs HVXXH, LEXXA, C588F, C699*, ΔSHP or ΔPIP (fwd and rev). For the *pW8-attB-V5:mh*^{ΔUBZ} plasmid, the C699* and C588F primer pairs were used sequentially.

pUASP-V5:mh: This plasmid was obtained by the cloning of two fragments in the *pUASP* vector: a 149bp fragment containing the V5 tag sequence fused in frame to the *mh* coding sequence that was PCR amplified from the *pW8-V5:mh* vector with the EcoRI-V5-MH and MH-SacII primers and a 2341bp genomic fragment covering the rest of the *mh* coding sequence and 1531bp downstream of the stop codon that was excised from the CH322-124H21 BAC using *SacII* and *XbaI*.

UV sensitivity assays

Third instar larvae were placed in plastic vials before UV irradiation (254 nm) in a BLX-E crosslinker (BIO-LINK). Larvae were then allowed to develop in standard medium. After 6 days at 25°C, all adults that emerged were counted. The percentage of survival to adulthood was calculated as the ratio between the number of emerged adults and the number of irradiated larvae. For each genotype and condition, 40 larvae were irradiated and the experiment was repeated 6 times.

Fertility Tests

Females of the indicated genotypes were allowed to mate with *wild-type* males for 2 days before overnight egg collection on standard medium. Eggs were allowed to develop at 25°C for 48 hours and hatched larvae were then counted to determine hatching rates.

Immunofluorescence and microscopy

Eggs or embryos were collected on agar plates, dechorionated in bleach, fixed in a 1:1 heptane/methanol mixture and stored in methanol at -20°C. Embryos were rehydrated in PBS-Triton 0.15% and stained as previously described [S13]. Ovaries were dissected in PBS-Triton 0.1% and fixed at room temperature in 4% formaldehyde in PBS for 25 minutes. Ovaries were then stained and mounted as embryos.

For polytene chromosomes preparation, salivary glands were dissected in PBS-Triton 0.1% and squashed as previously described [S14]. All samples were mounted in mounting medium (Dako) containing 5 µg/ml propidium iodide (Sigma) or containing 5 µM of DRAQ5® (Invitrogen). Confocal images were acquired using a LSM510 microscope (Carl Zeiss) and processed with Image J and Photoshop (Adobe) software.

EdU labeling of *Drosophila* zygotes

Adult females were starved for 12 hours in the presence of males. Females were then fed for 36 hours with yeast paste mixed with the thymidine analogue EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) at a final concentration of 35mM. Eggs were collected every 30 min and fixed in a 1:1 mixture of heptane/methanol. Females were still fed with yeast/EdU 35mM during egg collections. For EdU detection, eggs were rehydrated in PBS-Triton 0.15% and stained using the Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Imaging Kit (Molecular Probe).

RT-PCR

Total RNAs from at least 25 pairs of ovaries were extracted using the Trizol method (Invitrogen) following manufacturer instructions and treated with DNase I (Fermentas). First-strand cDNAs were synthesized from 0.5 µg total RNAs using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo-dT primers. V5-fwd and

mh-revB primers were used to specifically amplify *V5:mh* transgene cDNAs. Rp49-fwd and Rp49-rev primers were used as control.

List of primers

Primer name	Sequence (5' to 3')
EcoRI-promMH5'	CCGAATTCCTCGGAGCTTCGCCTTCTCC
promMH3'-ATG-EcoRI	GTGGAATTCCATGATGGTCGCCTTGTTGATCC
EcoRI-V5-MH	TAGAATTCGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCG ATTCTACGTCAGATGCAGACTACTTGTT
MH-SacII	TGCCGCGGCTGTGTAACCTTTGGTCTGAC
HVXXH-fwd	CTTTGTTTATCCAGCACGTAATGATCCATGCCTACTG
HVXXH-rev	CAGTAGGCATGGATCATTACGTGCTGGATAAACAAG
LEXXA-fwd	CTCTTTGTTTATCCAGCTCGAAATGATCGCTGCCTACTGCTTTGTGC
LEXXA-rev	GCACAAAGCAGTAGGCAGCGATCATTTGAGCTGGATAAACAAGAG
C588F-fwd	CATCGTATCTTGTCCCATTTTCTTTGAGAAAATGAGGCGC
C588F-rev	GCGCCTCATTTTCTCAAAGAAAATGGGACAAGATACGATG
C699*-fwd	AGACCGTAGGCTGACCCAGATGTGGCC
C699*-rev	GGCCACATCTGGGTCAGCCTACGGTCT
ΔSHP-fwd	CACCACTGAAATGAGCGGCTCTAGCGCTATAG
ΔSHP-rev	CTATAGCGCTAGAGCCGCTCATTTCACTGGTG
ΔPIP-fwd	CCCGATTCCGCTAAACTTCGTAGCGAAGATGC
ΔPIP-rev	GCATCTTCGCTACGAAGTTTAGCGGAATCGGG
mh-revB	CCGGTGTGGACTTCTTAGCCC
V5-fwd	TAACCCTCTCCTCGGTCTCG
Rp49-fwd	AAGATCGTGAAGAAGCGCAC
Rp49-rev	ACTCGTTCTCTTGAGAACGC

Supplemental References

- S1. Loppin, B., Berger, F., and Couble, P. (2001). Paternal chromosome incorporation into the zygote nucleus is controlled by maternal haploid in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 231, 383–96.
- S2. Li, X., Urwyler, O., and Suter, B. (2010). *Drosophila* Xpd regulates Cdk7 localization, mitotic kinase activity, spindle dynamics, and chromosome segregation. *PLoS Genet.* 6, e1000876.
- S3. Kane, D., Shusterman, M., Rong, Y., and McVey, M. (2012). Competition between replicative and translesion polymerases during homologous recombination repair in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 8, e1002659.
- S4. Easwaran, H., Leonhardt, H., and Cardoso, M. (2007). Distribution of DNA replication proteins in *Drosophila* cells. *BMC Cell Biology* 8, 42.
- S5. Sallé, J., Campbell, S., Gho, M., and Audibert, A. (2012). CycA is involved in the control of endoreplication dynamics in the *Drosophila* bristle lineage. *Development (Cambridge, England)* 139, 547–57.
- S6. Schuh, M., Lehner, C. F., and Heidmann, S. (2007). Incorporation of *Drosophila* CID/CENP-A and CENP-C into centromeres during early embryonic anaphase. *Curr. Biol.* 17, 237–43.
- S7. Clarkson, M., Wells, J., Gibson, F., Saint, R., and Tremethick, D. (1999). Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* 399, 694–7.
- S8. Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3312–7.
- S9. Kuroda, K., and Ueda, R. (1995). A 130 kDa polypeptide immunologically related to the 180 kDa catalytic subunit of DNA polymerase alpha-primase complex is detected in early embryos of *Drosophila*. *Journal of biochemistry* 117, 809–18.
- S10. Chang, Y.-C., Hung, W.-T., Chang, Y.-C., Chang, H., Wu, C.-L., Chiang, A.-S., Jackson, G., and Sang, T.-K. (2011). Pathogenic VCP/TER94 alleles are dominant actives and contribute to neurodegeneration by altering cellular ATP level in a *Drosophila* IBMPFD model. *PLoS Genet.* 7, e1001288.
- S11. Venken, K. J. T., Carlson, J. W., Schulze, K. L., Pan, H., He, Y., Spokony, R., Wan, K. H., Koriabine, M., de Jong, P. J., White, K. P., et al. (2009). Versatile P[acman] BAC libraries for transgenesis studies in *Drosophila melanogaster*. *Nat Meth* 6, 431–434.
- S12. Dubruielle, R., Orsi, G. A., Delabaere, L., Cortier, E., Couble, P., Marais, G. A. B., and Loppin, B. (2010). Specialization of a *Drosophila* Capping Protein Essential for the Protection of Sperm Telomeres. *Curr Biol*, 1–10.
- S13. Orsi, G. A., Algazeery, A., Meyer, R. E., Capri, M., Sapey-Triomphe, L. M., Horard, B., Gruffat, H., Couble, P., Aït-Ahmed, O., and Loppin, B. (2013). *Drosophila* Yemanuclein and HIRA Cooperate for De Novo Assembly of H3.3-Containing Nucleosomes in the Male Pronucleus. *PLoS Genet.* 9, e1003285.
- S14. Schwartz, B. E., Werner, J. K., and Lis, J. T. (2004). Indirect immunofluorescent labeling of *Drosophila* polytene chromosomes: visualizing protein interactions with chromatin

in vivo. Meth. Enzymol. 376, 393–404.

I.3. La plupart des acteurs impliqués dans la formation du pronoyau mâle ne sont pas affectés dans les œufs *mh*

Au cours de ma thèse, j'ai passé la majeure partie de mon temps à tenter de comprendre ce qui n'allait pas au niveau de la chromatine paternelle des embryons *mh*. Le phénotype se manifestant par une mauvaise condensation des chromosomes paternels, ainsi que par leur incapacité à se diviser, je me suis donc penchée sur les possibles défauts que pouvaient engendrer une réplication anormale et/ou une division anormale. Comme déjà énoncé dans l'article précédemment présenté, l'éviction des protamines ainsi que le dépôt des histones semble être globalement normaux dans la chromatine paternelle des œufs *mh*. A présent, je souhaiterais ici vous énumérer rapidement les expériences que j'ai mises en œuvre pour essayer de comprendre ce qui générerait le phénotype de *mh*. Tous ces résultats étant négatifs, je ne présenterai donc que ceux qui apportent quelque chose de nouveau quant à la localisation de certaines protéines ou d'une combinaison avec un autre mutant à la première division du zygote.

I.3.a. Les territoires chromosomiques paternels

La première chose que j'ai testée était de savoir si les chromosomes paternels avaient le variant d'histone centromérique Cid et s'ils étaient orientés normalement. Pour l'allèle *mh*^l, aucune perturbation n'avait été décrite à ce niveau (Loppin *et al*, 2001). Ici encore, je n'ai pu mettre en évidence aucun défaut dans les chromosomes paternels au niveau des centromères.

Ensuite, un phénotype semblable à celui de *mh* est induit par la mutation à effet paternel *K81*. Dans ce cas, ce qui engendre un pont de chromatine par les chromosomes paternels est un défaut de coiffe des télomères qui mène à leur fusion (Dubruille *et al*, 2010). Si le défaut de coiffe de télomère était général, les deux jeux de chromosomes seraient affectés et le mutant serait aussi certainement létal. J'ai donc uniquement marqué les télomères paternels en croisant des femelles mutantes pour *mh* avec des mâles exprimant la protéine K81 fusionnée à la GFP. J'ai pu constater que la protéine K81 était bien présente dans le noyau mâle et à la première division en contexte mutant pour *mh*, suggérant que les ponts de chromatine observés dans les œufs *mh* ne seraient pas dus à une fusion de télomères.

I.3.b. L'assemblage des fuseaux mitotiques

Les chromosomes paternels des œufs *mh* ne parviennent pas à se diviser correctement. Ceci pourrait notamment être induit par un mauvais attachement des microtubules au niveau des kinétochores paternels ou un attachement plus fragile et donc qui apporte moins de tension que du côté maternel (avec moins de microtubules), pouvant être un effet secondaire de la mauvaise condensation des chromosomes paternels. Les protéines qui gèrent ces processus sont les SACs. Comme énoncé en introduction, ces protéines sont présentes au niveau des kinétochores au début de la mitose jusqu'à ce que les chromosomes soient alignés et attachés aux fuseaux mitotiques. Ces protéines, par leur présence, empêchent donc l'entrée en anaphase. J'ai étudié la présence et la dynamique de l'une d'entre elles: BubR1 (correspondant à la protéine Mad3 chez la levure). La première mitose zygotique est si particulière et si rapide que la présence de cette protéine à ce stade ainsi que sa dynamique étaient inconnues. De plus, l'absence de *checkpoint* pour la réplication ainsi que pour les lésions d'ADN pendant les premières divisions syncytiales de l'embryon est présumée, notamment par l'absence de phase G1 et G2 (Sibon *et al*, 1999, 1997). Nous pouvions donc nous demander si ce *checkpoint* d'assemblage des fuseaux était présent au premier cycle. Pour le déterminer, j'ai utilisé une lignée de drosophile qui exprimait BubR1 fusionnée à la GFP en N-terminale. De façon remarquable, en contexte sauvage, cette protéine se localise en foyers en pro-métaphase, certainement au niveau des kinétochores, quand les chromosomes ne sont pas encore tout à fait condensés et alignés, à la première mitose (Figure 10), comme ce qui est déjà décrit dans la littérature dans les cellules somatiques chez de nombreuses espèces (Royou *et al*, 2010; Meraldi *et al*, 2004; Taylor *et al*, 2001). Le marquage est équivalent dans les deux jeux de chromosomes, disparaît à la fin de la métaphase et n'est plus présent par la suite. Dans les œufs *mh*², nous n'observons pas de différence de dynamique de marquage GFP::BubR1 (Figure 10). De plus, les foyers de BubR1 ne sont plus présents dans les chromosomes paternels quand les chromosomes maternels sont en anaphase suggérant un attachement suffisant des fuseaux mitotiques au niveau des kinétochores pour que cette protéine soit détachée.

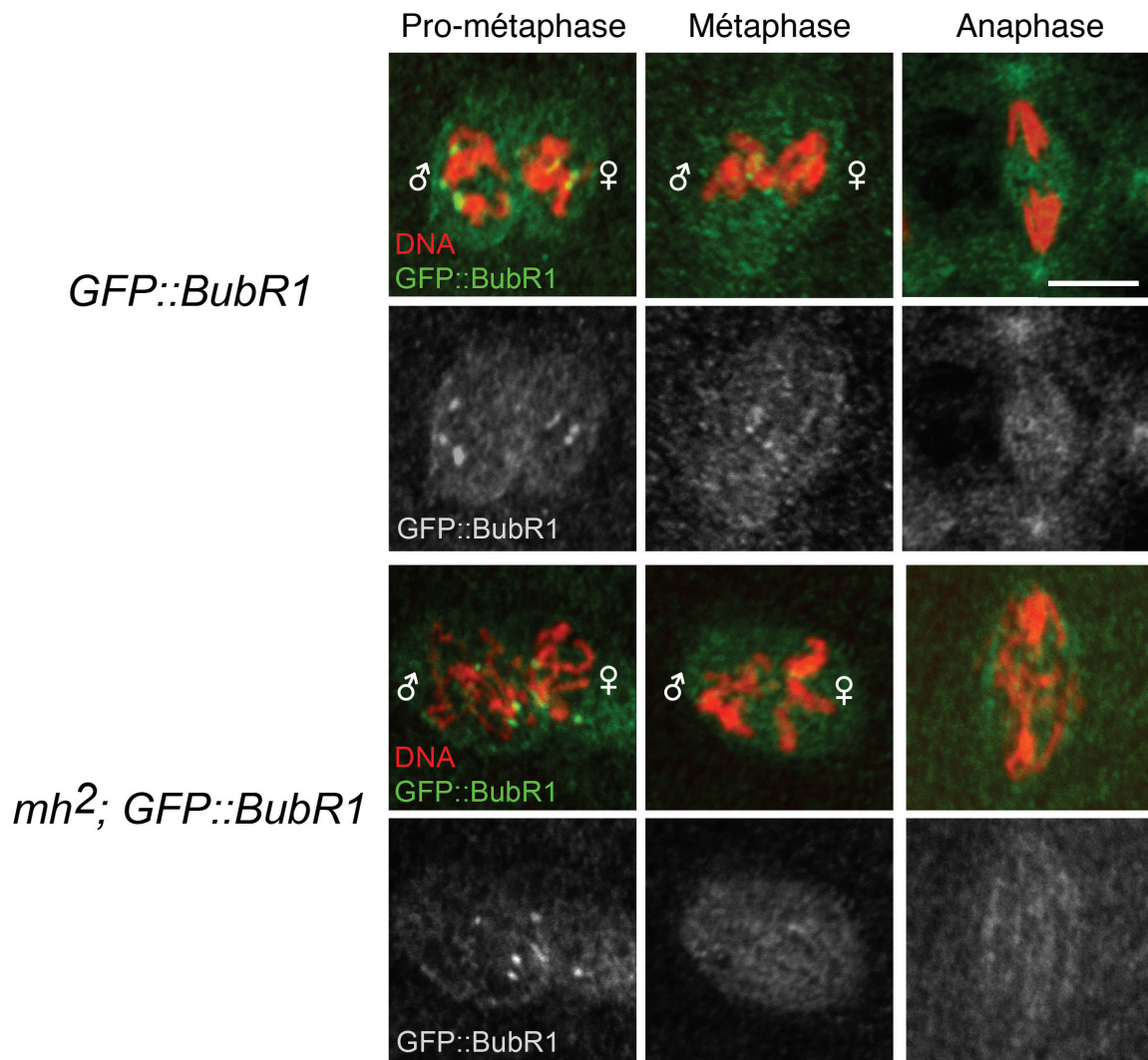


Figure 10: BubR1 se localise en foyer sur les chromosomes en prométaphase

Images de microscopie confocale montrant une première mitose zygotique dont les stades sont indiqués en haut. Les génotypes des femelles sont indiqués sur la gauche. L'ADN est marqué par du iodure de propidium (rouge) et GFP::BubR1 par un anticorps anti-GFP (vert).

Le *checkpoint* d'assemblage des fuseaux BubR1, fusionnée à la GFP, se localise en foyers dans les chromosomes en pro-métaphase qui disparaissent en métaphase dans les embryons *GFP::BubR1* en contexte sauvage (haut) ou mutant pour *mh* (bas).

Barre : 10µm

I.3.c. La synchronisation des deux pronoyaux au premier cycle zygotique

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer que les chromosomes paternels sont mal condensés et qu'ils ne parviennent pas à se diviser, pourrait être que ces chromosomes sont en retard par rapport aux maternels. Ils ne seraient pas encore totalement condensés et bien alignés que déjà ils seraient tirés vers les deux pôles par les fuseaux mitotiques orchestrés par la division des chromosomes maternels. Leur séparation précoce engendrerait donc un pont de chromatine dû à une incomplète individualisation de leurs chromosomes. Pour tester cette hypothèse, j'ai mis la mutation *mh* dans un contexte mutant pour le gène *KLP3A*. *KLP3A* est un gène codant pour une protéine de type kinésine. La mutation *KLP3A*¹⁶¹¹ a été décrite comme provoquant une stérilité femelle. Les œufs pondus par les femelles homozygotes arrêtent leur développement très tôt. En effet, le pronoyau femelle ne parvient pas à migrer vers le pronoyau mâle pour entrer dans la première division. Le pronoyau mâle, lui, une fois sa réplication complétée, condense ses chromosomes mais reste bloqué en métaphase (Williams *et al*, 1997). Cette mutation pouvait donc me permettre d'observer la condensation des chromosomes paternels en m'affranchissant du rythme imposé par ceux d'origine maternelle. Si ceux-ci sont juste en retard, seuls, ils devraient se condenser normalement. Pour cette expérience, pour des raisons techniques, j'ai recombiné *mh*² avec soit la mutation *KLP3A*¹⁶¹¹ soit avec la déficience couvrant ce gène (*Df(1)ED6579*), afin d'obtenir la mutation *mh*² dans un contexte trans-hétérozygote pour *KLP3A*. J'ai ensuite marqué ces embryons avec un anticorps reconnaissant la di-méthylation de H3K27 (H3K27me2), qui permet la reconnaissance de la chromatine maternelle uniquement. De façon surprenante, en utilisant cette combinaison allélique de *KLP3A* en contexte sauvage, les chromosomes paternels ne s'arrêtent pas en métaphase du premier cycle, mais continuent leur division pour donner des embryons haploïdes androgénétiques (Figure 11). Cependant, cette mutation, combinée avec *mh*², ne permet pas aux chromosomes paternels de se condenser, ni de se diviser correctement (Figure 11). Ce résultat suggère donc que les défauts observés dans les œufs *mh*², ne seraient pas expliqués par un retard des chromosomes paternels par rapport à ceux d'origine maternelle.

Si le retard ne peut pas donner d'explication quant à la morphologie des chromosomes paternels, un défaut de réplication en revanche, pourrait justifier le problème de condensation et de division de ceux-ci. Dans l'article présenté ci-dessus, nous soupçonnons fortement une altération dans la duplication du génome paternel. Cependant la fonction de MH n'est pas

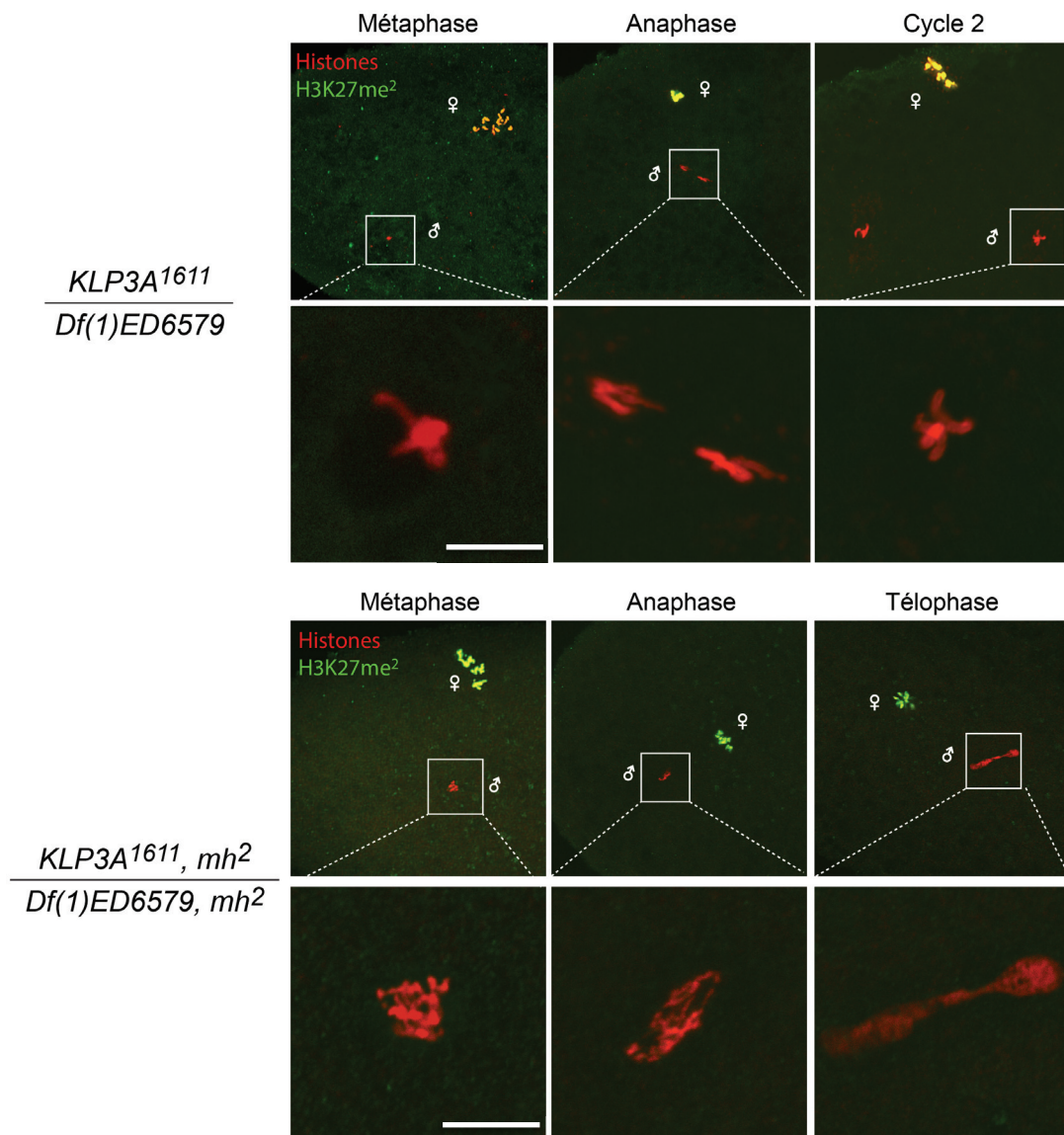


Figure 11 : Les chromosomes paternels ne parviennent pas à se diviser même sans ceux d'origine maternelle dans les embryons mh^2

Images de microscopie confocale d'œufs issus de femelles dont le génotype est indiqué sur la gauche. La chromatine est marquée par un anticorps anti-histone (rouge) et la chromatine maternelle par un anticorps anti-H3K27me2 (vert). Les stades présentés sont indiqués au dessus.

(A) La combinaison allélique $KLP3A^{1611}/Df(1)ED6579$ engendre une stérilité femelle. Dans les œufs pondus, le pronoyau femelle ne migre pas, laissant les chromosomes paternels se diviser tout seul.

(B) La mutation mh^2 associée aux allèles de $KLP3A$ ne permet pas aux chromosomes paternels de se condenser normalement ni de se diviser, même si les chromosomes maternels sont absents

Barres : 10 μ m

directement liée à la réplication puisque nous n'observons pas la présence de cette protéine pendant la phase S. Par contre, les résultats présentés dans l'article indiquent clairement qu'elle opère dans le noyau mâle une fois la très grande majorité des protéines de type protamines enlevées et remplacées par des histones. L'hypothèse privilégiée est donc que MH permettrait de préparer la chromatine paternelle à la première réplication lors de la décondensation de son noyau, en maintenant l'intégrité de son ADN. Les défauts de réplication fortement soupçonnés dans le noyau mâle des œufs *mh*, pourraient néanmoins être dus à plusieurs facteurs qui seraient inhérents à la conformation unique du noyau du spermatozoïde.

1.3.d. Les protéines chromatinienne du sperme

Tout d'abord, un élément qui pourrait altérer la première réplication dans le noyau mâle, serait la présence de protéines chromatinienne du sperme résiduelles. Dans les œufs *mh*, nous avons pu voir que le pronoyau mâle se décondensait normalement, suggérant que les SNBPs sont globalement enlevés. Cependant, certaines de ces protéines pourraient être bloquées dans la chromatine du sperme. Sachant que le spermatozoïde pourrait être soumis à des stress environnementaux pendant son stockage, comme un stress oxydatif, ceux-ci pourraient induire des liaisons covalentes entre les SNBPs et l'ADN paternel. Si ces protéines restent liées à l'ADN, elles pourraient bloquer toute la machinerie de réplication à certains endroits du génome engendrant une réplication incomplète et donc, un défaut de condensation des chromosomes ainsi que leur incapacité à se diviser. J'ai donc vérifié par immunofluorescence l'absence de ces protéines dans le pronoyau mâle à la fécondation. Pour cela j'ai utilisé une souche qui exprimait la protamine A fusionnée à la GFP en C-terminale en contexte mutant pour les deux gènes de protamine (*Mst35Ba* et *Mst35Bb*) (Tirmarche *et al*, 2014), pour que la seule source de protamine A soit détectable avec un marquage anti-GFP. J'ai croisé ces mâles avec des femelles sauvages ou *mh*² et récolté les embryons précoces obtenus. Les œufs marqués avec un anticorps anti-GFP ne montrent aucun marquage clair dans les deux cas. La même chose a été observée avec une souche exprimant *Mst77F::GFP* en contexte sauvage cette fois. Ces résultats ne sont pas illustrés ici, mais suggèrent qu'il ne reste pas de protéines chromatinienne du sperme dans les œufs *mh*². Cependant, la présence d'une quantité très faible de protamines pourrait perturber la réplication et serait très certainement

en deçà du seuil de détection par immunofluorescence. Pour palier à cela, j'ai croisé des femelles *mh*² avec des mutants nuls pour les protamines qui sont toujours fertiles (Tirmarche *et al*, 2014). Si la présence de quelques protamines persistantes, à la formation du zygote, engendre le phénotype de *mh*, il devrait être sauvé par l'absence de ces protéines dans le noyau du spermatozoïde. Le résultat est sans appel, aucune amélioration n'est permise par l'absence de ces protéines dans les œufs *mh*² (Figure 12). Cette expérience exclut donc l'implication des protamines A et B dans l'incapacité des chromosomes paternels à se diviser à la première mitose zygotique.

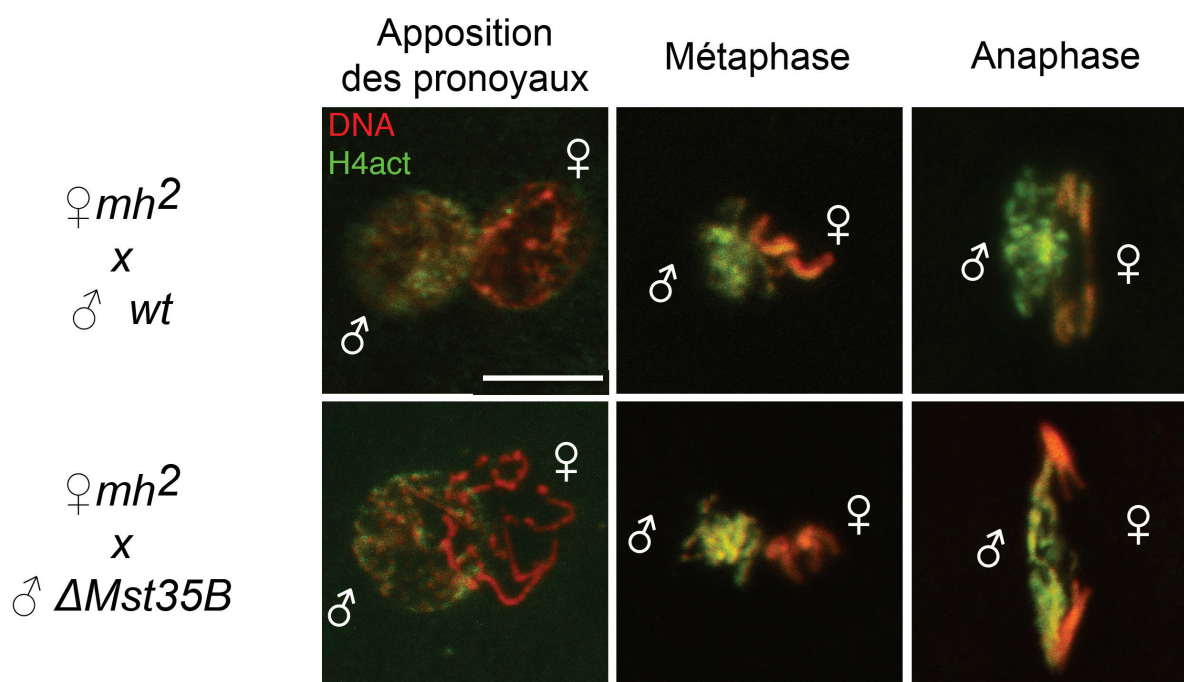


Figure 12: Le phénotype de *mh*² n'est pas engendré par des protamines persistances
 Images confocales d'œufs issus de femelles *mh*² fécondées par des mâles dont le génotype est indiqué sur la gauche. L'ADN est marqué par du iodure de propidium (rouge) et la chromatine paternelle par un anticorps anti-H4 acétylé (H4act) (vert). Les stades sont indiqués en haut et la chromatine paternelle et maternelle est notée avec des symboles. L'absence de protamines dans le noyau du sperme n'améliore pas le phénotype induit par *mh*², suggérant qu'il n'est pas dû à la persistance de ces protéines.
 Barre : 10µm

1.3.e. La topologie de l'ADN paternel

Nous savons qu'une altération de la progression de la fourche de réplication, peut être engendrée par des structures secondaires de l'ADN, comme des épingles à cheveux ou des quadruplexes de guanine. Ces structures peuvent être induites à la formation d'un simple brin d'ADN. Le remodelage du noyau du sperme à la fécondation serait susceptible d'induire des simples brins temporaires dont les structures secondaires ainsi formées seraient résolues par les topoisomérases. Si MH intervient dans ces processus et coopère avec ces protéines il est probable que leur localisation ou leur dynamique pourrait être affectée dans les mutants *mh*. Je me suis donc penchée sur la présence des topoisomérases pendant le remodelage de la chromatine paternelle et au premier cycle. Pour cela, j'ai testé deux anticorps commerciaux reconnaissant les deux types de topoisomérases. L'anticorps reconnaissant la topoisomérase I n'a montré aucun marquage que ce soit dans les embryons précoces sauvages ou *mh*² (non montré). Malheureusement, comme aucun contrôle positif n'a pu être établi, nous ne pouvons rien conclure au niveau de cette expérience. Le marquage entrepris avec l'anticorps anti-topoII α (une seule topoisomérase de type II est présente chez la drosophile), nous a par contre indiqué que dans les œufs sauvages, la topoisomérase II était présente pendant le premier cycle zygotique. Cette protéine est en effet détectée au moment de la réplication dans les deux pronoyaux et forme des petits foyers (Figure 13). Ceci suggérerait qu'elle pourrait intervenir au niveau des fourches de réplication, pour leur permettre de progresser. Dans les œufs *mh*², encore une fois, aucune différence n'a pu être mise en évidence (Figure 13). Néanmoins, cette expérience est intéressante puisqu'elle nous informe sur la localisation et la dynamique de la topoisomérase II à la formation du zygote. La transition histone-protamine pendant la spermiogénèse induit une reconfiguration topologique de l'ADN du spermatozoïde grâce aux topoisomérases I et II (Rathke *et al*, 2014; Meyer-Ficca *et al*, 2011; Ward, 2011; Akama *et al*, 1998). Cependant, rien n'est démontré quant au processus inverse qui intervient lors de la fécondation. Dans les œufs fécondés de drosophile, nous ne pouvons pas conclure quant à l'absence des topoisomérases au cours de l'enlèvement des protamines, car nous n'avons pas accès à cette étape pour des raisons techniques. Cependant, la topoisomérase II n'est pas retrouvée au niveau du noyau mâle en décondensation pendant que MH fonctionne (métaphase de méiose II) suggérant que ces deux protéines ne sont pas liées fonctionnellement.

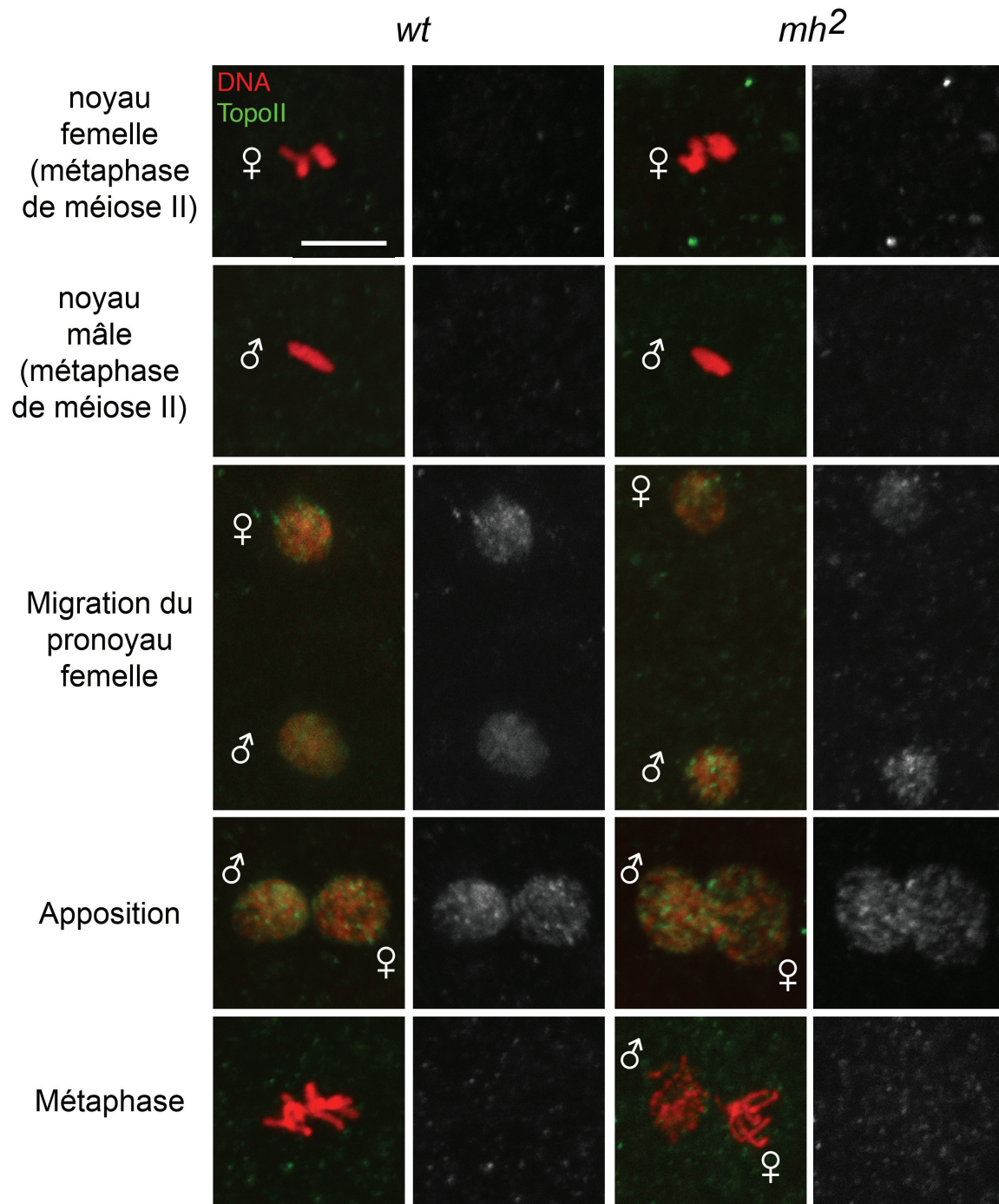


Figure 13: La topoisomérase II se localise au niveau des deux pronoyaux pendant la réplication du zygote

Images confocales d'œufs issus de femelles du génotype indiqué. L'ADN est marqué par du iodure de propidium (rouge) et la topoisomérase II est marquée avec un anticorps anti-topoII α (vert). Les stades sont indiqués sur la gauche et les pronoyaux mâles et femelles sont notés avec des symboles. Aucune différence n'est observée au niveau du marquage dans les embryons précoces sauvages (*wt*) ou *mh²*.

Barre: 10 μ m

1.3.f. Les lésions d'ADN liées à l'unique conformation de la chromatine paternelle

Les raisons qui engendreraient une perturbation de la réplication au niveau du pronoyau mâle dans les mutants *mh* sont plutôt limitées, d'autant plus que celles-ci seraient directement liées à la conformation unique du noyau du spermatozoïde à la fécondation. Une des hypothèses privilégiée est la présence de lésions d'ADN persistantes incompatibles avec la première réplication. En effet, comme je l'ai abordé en introduction, le spermatozoïde serait soumis à des stress oxydatifs pouvant engendrer des lésions dans l'ADN paternel. Ensuite, comme c'est le cas pendant la transition histone-protamine, des cassures transitoires pourraient être induites par le remodelage même de la chromatine paternelle à la fécondation. Ces dommages d'ADN, s'ils sont présents, comme suggéré avec le marquage γ H2A.Z présenté dans l'article (données supplémentaires), doivent être réparés par une activité d'origine maternelle qui pourrait faire intervenir la protéine MH. En outre, si ces lésions ne sont pas réparées avant la réplication, cela pourrait provoquer des cassures double-brins pendant la phase S, si la fourche de réplication les rencontre. Même si le marquage γ H2A.Z ne persiste pas dans le noyau mâle après l'apposition des deux pronoyaux, des lésions pourraient toujours être présentes mais ne plus être signalées par cette marque. De façon alternative, certaines lésions pourraient ne pas être réparées par cette voie. J'ai donc tenté de tester d'autres marqueurs de dommages d'ADN, comme avec une expérience de TUNEL qui permet de mettre en évidence l'ADN fragmenté, ainsi qu'un marquage reconnaissant les CPDs (des *photoproducts*) qui peuvent être engendrés par une exposition aux UV par exemple. Malheureusement ces expériences n'ont pas été concluantes notamment à cause d'un manque d'embryons précoces ayant ces types de lésions.

Le complexe hétérotrimérique RPA, qui sert à protéger les simples brins d'ADN pendant la réplication, est également impliqué dans plusieurs voies de réparation. Son implication dans la voie de recombinaison homologue n'est d'ailleurs plus à démontrer (Binz *et al*, 2004). Cependant, ce processus de réparation est exclus dans le noyau mâle au moment où MH fonctionne car il n'y a ni chromatide sœur ni chromosome homologue à proximité. RPA est aussi impliqué dans le *non-homologous end joining* (NHEJ) permettant de rabouter deux extrémités d'une cassure double-brin, ainsi que dans la voie de BER (Ghosal & Chen, 2013), qui permet d'enlever une base endommagée et de réparer la cassure ainsi formée. Pour étudier sa localisation et sa dynamique dans le zygote, j'ai utilisé une lignée transgénique

exprimant Rpa70, la sous unité principale du complexe, fusionnée à l'EGFP en C-terminale. Dans les embryons contrôles, Rpa70::EGFP se localise uniquement au niveau des deux pronoyaux en réplication (Figure 14) ce qui n'est pas étonnant, connaissant son rôle au niveau de la fourche de réplication. Dans les embryons *mh*² aucune différence n'est détectée et aucun marquage n'est présent au moment de la décondensation du pronoyau mâle (Figure 14), suggérant que cette protéine n'intervient pas dans un processus de réparation de l'ADN au cours de la décondensation du noyau mâle.

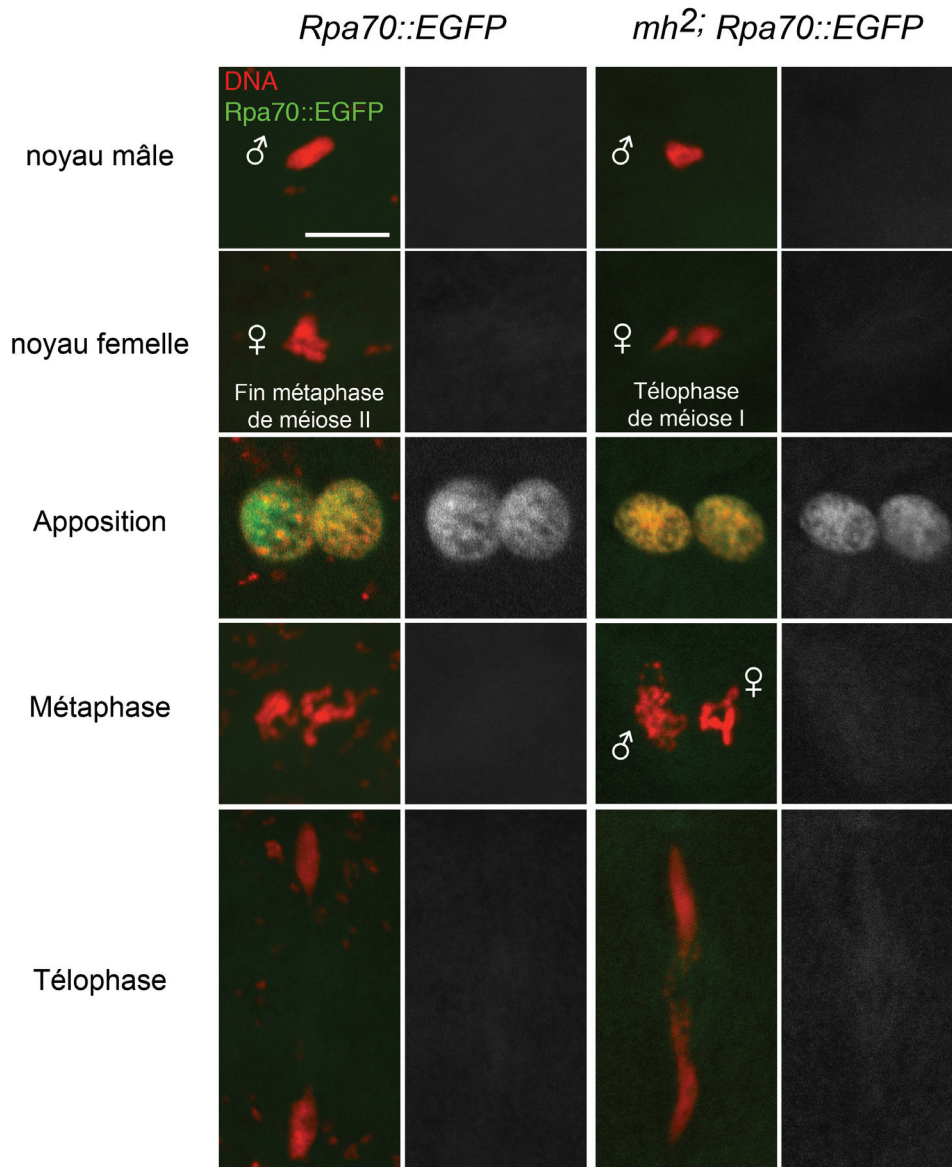


Figure 14: *Rpa70::EGFP* se localise au niveau des deux pronoyaux pendant la réplication du zygote.

Images confocales d'œufs issus de femelles du génotype indiqué. L'ADN est marqué par du iodure de propidium (rouge) et *Rpa70::EGFP* est détectée avec un anticorps anti-GFP (vert). Les stades sont indiqués sur la gauche et les pronoyaux mâles et femelles sont notés avec des symboles. Aucune différence n'est visible au niveau du marquage *Rpa70::EGFP* quand le transgène est exprimé en contexte sauvage ou *mh2*. Les points d'ADN autour des noyaux dans les embryons précoces *Rpa70::EGFP* sont des bactéries symbiotiques (*Wolbachia*).

Barre: 10µm

1.4. Discussion autour du rôle de MH dans la formation du zygote et de la maintenance de l'intégrité du génome paternel

Après plus de trois ans à caractériser la fonction de la protéine MH, son implication moléculaire dans la formation du pronoyau mâle reste encore mal définie. Cependant, j'ai pu constater, au cours de ma thèse, que sa fonction somatique décrite dans des cellules humaines était conservée chez la drosophile. Pourtant, le rôle crucial que joue cette protéine se trouve uniquement au cours de la formation du zygote. Elle permettrait à l'ADN du sperme de pouvoir entrer dans la phase de réplication de façon intégrée ou de passer cette phase sans compromettre l'intégrité du pronoyau mâle.

1.4.a. La réplication de l'ADN paternel

Le phénotype de condensation anormale des chromosomes paternels nous oriente sur un défaut de réplication. En effet, comme nous avons pu le voir avec la déplétion de l'ADN polymérase ϵ , la perturbation de la phase S engendre le même phénotype que dans les chromosomes paternels des œufs *mh* sans affecter la dynamique de localisation de PCNA. De plus, des résultats préliminaires dans les embryons déplétés en ADN pol ϵ ont montré l'incorporation d'un analogue de thymine (EdU) dans les pronoyaux qui suggérerait que la réplication est au moins initiée (non montré), comme ce que l'on observe dans les chromosomes paternels des œufs *mh*². Un phénotype très similaire à *mh*, est celui engendré par l'incompatibilité cytoplasmique (CI). Le CI provient d'un croisement incompatible entre un mâle infecté par la bactérie symbiotique *Wolbachia*, et une femelle non infectée, chez de très nombreux arthropodes comme la guêpe *Nasonia vitripennis* ou *Drosophila simulans* (Landmann *et al*, 2009; Tram *et al*, 2006; Charlat & Merçot, 2001). Dans cette situation, les chromosomes paternels sont anormalement condensés et ne parviennent pas à se diviser. Cependant, il semblerait que le problème qui se pose serait un retard du cycle du pronoyau mâle par rapport au femelle comme ce qui a été montré avec la persistance de PCNA au niveau de la chromatine paternelle au moment de la métaphase zygotique (Landmann *et al*, 2009). Ici encore, la réplication incomplète ou son retard induit le phénotype que l'on observe dans les œufs *mh*². Néanmoins, il faudrait pouvoir clairement prouver que la duplication de l'ADN paternel n'est pas complète dans ces mutants. Malheureusement, la difficile

accessibilité de la première division zygotique ainsi que le peu d'outils disponibles pour étudier la réplication par immunofluorescence ne nous donne pas la capacité de l'évaluer.

Sachant que MH fonctionne avant la réplication, il faudrait comprendre ce qui pourrait perturber la réplication, en amont de la phase de synthèse de l'ADN. A la formation du zygote comme dans les 10 premiers cycles de l'embryon, chez la drosophile, les cycles s'enchaînent très rapidement avec des phases de réplication et de division. En effet, il n'y a ni G1 ni G2 et toutes les origines de réplication seraient activées en même temps. Si une lésion d'ADN survient pendant cette période ou est déjà présente, le cycle ne peut pas s'arrêter ni ralentir pour permettre leur réparation (Raff, 2003; Sibon *et al*, 2000). Nous pouvons aussi nous demander si le processus de TLS peut être mis en place pendant ces cycles extrêmement rapides. Dans ce contexte, il semble donc indispensable que les deux pronoyaux soient intègres à l'entrée dans le premier cycle zygotique, et particulièrement le pronoyau mâle qui est potentiellement soumis à plus de dommages.

I.4.b. Les lésions d'ADN

Une étude sur les neuroblastes de larves de drosophile, a montré que la réparation des cassures double-brins engendrait la formation d'une sorte de lien très fin entre les deux fragments et que les morceaux de chromatides acentriques pouvaient être finalement ségrégés correctement notamment grâce à la protéine BubR1 qui se localise au niveau de ce lien (Royou *et al*, 2010). Cependant, ce processus n'est pas immédiat, et des sortes de chromosomes retardataires se forment jusqu'à leur ségrégation. Au niveau des chromosomes paternels des embryons *mh*², la présence de cassures double-brins pourrait être possible. Les liens ténus qui connecteraient les morceaux de chromosomes pourraient aussi expliquer l'aspect irrégulier qu'ils présentent. Cependant, je n'ai jamais clairement observé la présence de BubR1, ni au niveau des chromosomes paternels en division, ni dans les ponts de chromatine formés par la ségrégation anormale de ces chromosomes. Nous pouvons donc conclure que, soit la rapidité des cycles ne permet pas ce processus, soit il n'y a pas de cassure double-brin, ou encore, cette fonction spécifique de BubR1 n'intervient pas pendant cette division si particulière.

Si des lésions d'ADN, déjà présentes dans le noyau du spermatozoïde ou engendrées par le blocage de la fourche de réplication, expliquaient la division anormale des chromosomes paternels, nous nous attendrions à voir des foyers γ H2A.Z persistants. Toutefois, ceux-ci ne sont plus présents, une fois la réplication initiée. Chez les rongeurs, la présence de foyers γ H2A.X comme marqueur de lésions d'ADN dans le zygote, en condition physiologique normale, est discutée. Ils ne sont en effet pas uniquement détectés dans le pronoyau mâle mais aussi au niveau des noyaux femelles notamment pendant la fin de la méiose (Ziegler-Birling *et al*, 2009; Derijck *et al*, 2006). Finalement, même si des lésions d'ADN au moment du remodelage de la chromatine paternelle ou de sa déméthylation ont été mis en évidence (Wossidlo *et al*, 2010; Bizzaro *et al*, 2000), la présence des foyers γ H2A.Z, en conditions normales, est plutôt associée à l'incorporation des histones (Ziegler-Birling *et al*, 2009; Derijck *et al*, 2006; Dimitrov *et al*, 1994). Chez la drosophile, on trouve ces foyers uniquement dans la chromatine paternelle. Cependant, le variant d'histone H2A.Z n'est pas présent dans la chromatine des produits de méiose (non publié). Nous pouvons donc nous demander si la présence de ces foyers relève d'une activité de réparation ou simplement de l'incorporation des variants d'histones dans le pronoyau mâle qui pourraient être phosphorylés. Néanmoins, il n'est pas exclu que le noyau du spermatozoïde arrive dans l'œuf avec des lésions d'ADN et/ou que le remodelage de sa chromatine induise des cassures, qui ne seraient pas signalées avec des foyers γ H2A.Z. De façon remarquable, on sait que les lésions d'ADN peuvent être réparées sans son équivalent : γ H2A.X, dans les cellules humaines (Celeste *et al*, 2003). De plus, l'absence de la queue C-terminale empêchant la phosphorylation de H2A.Z, dans les mutants $H2A.Z^{ACT}$, utilisés comme contrôle dans l'article, n'engendre pas de défauts lors de la première division des chromosomes paternels dans le zygote de drosophile, suggérant que cette marque est dispensable pour le maintien de l'intégrité du pronoyau mâle. Si les lésions d'ADN du pronoyau mâle sont signalées par une autre voie, cela expliquerait que les foyers γ H2A.Z ne persistent pas dans les œufs mh^2 alors que l'ADN paternel pourrait être endommagé. Il faudrait donc tester d'autres marqueurs de lésions pour savoir si le pronoyau mâle entre dans la première réplication avec des lésions non réparées en contexte mutant pour mh .

La fonction de MH dans le TLS au niveau des cellules somatiques reste énigmatique par rapport à son rôle à la fécondation. Si MH était impliquée dans ce processus nous nous attendrions à localiser cette protéine dans le pronoyau mâle au moment de la réplication, or ce n'est pas le cas. De façon remarquable, des études ont montré qu'un processus de type TLS

pouvait être présent en dehors de la phase S (Soria *et al*, 2009; Sarkar *et al*, 2006). Par exemple, pour réparer les ICLs, un couplage de la voie de réparation d'excision de nucléotides (NER) puis de TLS serait mis en place (Sarkar *et al*, 2006). Néanmoins, ces voies font aussi intervenir la protéine PCNA qui est absente du pronoyau mâle avant la réplication chez la drosophile, suggérant que ce processus n'est pas présent à ce moment là.

Nous avons vu en introduction que les ICLs, les pontages covalents entre l'ADN et des protéines, les altérations de bases et les structures secondaires de l'ADN pouvaient être tolérés pendant la réplication par le TLS. Ces lésions pourraient être présentes dans le pronoyau mâle. Or, nous ne savons pas si ce processus intervient pendant les premiers cycles du développement de la drosophile. Bien que cela ne constitue pas une preuve de son absence, nous n'observons jamais de foyers de PCNA dans les pronoyaux, contrairement aux cellules somatiques. En outre, l'absence de la polymérase TLS, ADN pol η n'affecte pas la fertilité des femelles (non montré). Les lésions d'ADN énoncées ci-dessus, possiblement présentes dans l'ADN paternel, pourraient être réparées avant le premier cycle zygotique. Dans ce cas, un TLS alternatif pourrait être mis en œuvre pendant le remodelage de la chromatine paternelle en faisant intervenir la protéine MH. Par exemple, un autre complexe *sliding clamp* trimérique que PCNA a été décrit. Il aurait en effet, lui aussi une forme en anneau, c'est le complexe 9-1-1 (Rad9, Rad1 et Hus1 chez l'Homme). 9-1-1 a été décrit comme impliqué dans le *checkpoint* de réplication en recrutant à la chromatine, des éléments essentiels pour la recombinaison homologue comme Top-BP1, ainsi qu'en activant Chk1 (Kai, 2013). Il serait aussi un senseur de lésions d'ADN et par son interaction avec des protéines de réparation, comme les polymérases translesionnelles, il pourrait également avoir un rôle dans le TLS (Kai, 2013). De façon intéressante, récemment, il a été démontré qu'en plus de son importance dans le mécanisme de changement de matrice ADN à la réplication, 9-1-1 est aussi impliqué dans ce mécanisme de façon indépendante de la fourche de réplication en G2/M (Karras *et al*, 2013). Chez la drosophile, ce complexe est conservé et les études entreprises à ce jour, montrent qu'il intervient au moment de la méiose femelle pendant la recombinaison homologue (Kadir *et al*, 2012; Peretz *et al*, 2009). Au vu des multiples rôles que semble avoir 9-1-1, nous pouvons nous demander s'il pourrait agir pendant la formation du pronoyau mâle dans un TLS alternatif.

De façon intéressante, il a par ailleurs été énoncé que le noyau du spermatozoïde était particulièrement susceptible à la formation d'ICLs (Bennetts *et al*, 2008). Comme ces lésions sont réparées grâce à l'intervention de la voie de TLS (Williams *et al*, 2012; Deans & West,

2011; Ho & Schärer, 2010; Räsche *et al*, 2008; Sarkar *et al*, 2006), nous sommes demandé si MH était impliquée dans la réparation de ces lésions en cellules somatiques. J'ai donc testé la sensibilité des mutants *mh²* à un agent pontant de l'ADN, la moutarde azotée (ou *nitrogen mustard*), mais aucune sensibilité n'a pu être mise en évidence (non montré). Ceci peut être expliqué soit, parce que MH n'est pas impliquée dans la réparation des ICLs, ou parce que les pontages qui pourraient être présents dans le spermatozoïde sont uniques (entre deux brins d'ADN adjacents par exemple). Malheureusement, rien n'est connu sur l'existence de telles lésions dans le noyau du sperme et les outils disponibles ne permettent pas de le tester.

Très récemment, une étude a démontré l'importance de la protéine Wss1 chez la levure pour permettre la résolution de pontage covalent entre l'ADN et la topoisomérase I grâce à son activité métalloprotéase (Stinge *et al*, 2014). En effet, pendant le processus de relâchement de l'ADN, la topoisomérase passe par une étape très transitoire où elle forme un pontage covalent avec l'ADN. Cependant, si la ligation des deux brins d'ADN est empêchée par certaines lésions, ou si l'activité de la topoisomérase est inhibée par une drogue comme la camptothécine, ce lien avec l'ADN persiste et devient délétère pour la cellule. La plupart des protéines pontées à l'ADN sont enlevées par la voie NER. Pour celles qui échappent à cette voie, la protéine Wss1 digérerait la protéine pour permettre le passage des hélicases à la réplication. Comme la protéase ne digérerait pas entièrement la protéine pontée, le fragment qui demeure pourra être outrepassé par le TLS et l'ADN être ensuite réparé (Stinge *et al*, 2014). De façon remarquable, Wss1 a une structure similaire aux protéines de type MH. En N-terminale elle arbore un grand domaine métalloprotéase, se poursuivant par un domaine SHP et VIM (*VCP Interactive Motif*) liants VCP/p97, et finissant en C-terminale par deux domaines liants des groupements SUMO (Stinge *et al*, 2014). Nous n'avons pas trouvé d'orthologue de MH chez la levure et il n'existe pas non plus d'orthologue clairs de Wss1 chez les animaux. Les auteurs de l'article proposent donc que Wss1 pourrait être une protéine de type Spartan.

Pendant le remodelage de la chromatine paternelle, nous ne savons pas si la topoisomérase I a une fonction. La topoisomérase II par contre n'est pas localisée dans le noyau mâle à cette étape. Néanmoins, si elles sont présentes à un niveau très bas, elles pourraient être indétectables par immunofluorescence. De façon intéressante, les auteurs de cette étude, proposent que la fonction de Wss1 pourrait être un peu plus large et qu'elle pourrait permettre la résolution des pontages covalents de l'ADN avec d'autres protéines que les topoisomérases (Stinge *et al*, 2014). En outre, les lésions produites par l'exposition aux

UV peuvent également être la formation de liens entre l'ADN et des protéines. Comme les mutants *mh*² sont hypersensibles aux UV, nous pouvons donc penser que la fonction de MH serait de dégrader les protéines bloquées sur la chromatine qui auraient échappé à la voie de réparation NER, en cellules somatiques.

Cette fonction correspondrait étonnamment bien avec celle que pourrait avoir MH à la formation du zygote. Ceci expliquerait aussi la très forte conservation du domaine SprT qui contient le motif métalloprotéase, et dont la fonction restait très énigmatique. Pour tester cette hypothèse il faudrait connaître quelles protéines pourraient être attachées à l'ADN paternel spécifiquement à la fécondation. Soit des protéines chromatiniennes spécifiques du spermatozoïdes non identifiées pourraient rester pontées à l'ADN, soit le remodelage de la chromatine paternelle elle même engendrerait ce genre de lésions comme avec les topoisomérases.

La fonction moléculaire de MH et de ses orthologues reste encore floue, que ce soit au niveau somatique, ou pendant la formation du zygote où elle est indispensable. MH étant bien conservée parmi les espèces, cela impliquerait que sa fonction est importante de manière générale chez les animaux. Comme son rôle somatique semble être très similaire que ce soit chez la drosophile ou chez l'Homme, elle pourrait jouer une fonction non négligeable au moment de la fécondation chez tous les animaux. Il serait donc très intéressant de savoir si elle est également présente au niveau du pronoyau mâle, et si elle permet sa formation chez d'autres espèces.

Chez *C. elegans* par exemple, des travaux préliminaires au sein du laboratoire nous ont permis de montrer une diminution du nombre de progénitures chez les mutants nuls de l'orthologue de MH (se nommant à présent CeDVC1 (Mosbech *et al*, 2012)). Les mêmes résultats ont d'ailleurs été décrits par le Dr Anna Mosbech et ses collègues avec le même mutant ainsi qu'avec de l'ARN interférence (Mosbech *et al*, 2012). Cependant, aucune létalité embryonnaire n'a pu être mise en évidence suggérant une fonction différente de CeDVC1 pour la fertilité que chez la drosophile. Ceci pourrait être en partie expliqué par la grande différence qu'il existe au niveau des spermatozoïdes de nématodes par rapport aux autres espèces. Ces spermatozoïdes n'ont en effet pas de flagelle et se déplacent grâce à des pseudopodes (Sepsenwol *et al*, 1989). Ils n'ont pas particulièrement de condensation de leur noyau mais leur ADN est au moins en partie organisé avec des SNBPs (Chu *et al*, 2006). Leur transcription est en revanche également significativement réduite, voir inhibée (Shakes *et al*,

2009). Le fait que ces nématodes soient hermaphrodites et que la fécondation se passe au sein de la spermathèque pourrait expliquer qu'ils n'ont pas besoin de protéines de type protamine et que leur génome serait moins exposé à des stress environnementaux. De plus, dans les noyaux des spermatozoïdes matures, on retrouve encore des histones en grande quantité comme le variant H3.3 (Ooi *et al*, 2006). La conformation de l'ADN du sperme de *C. elegans* serait donc plus proche des cellules somatiques que chez d'autres espèces comme les mammifères ou la drosophile, leur conférant un remodelage de leur chromatine moins important à la fécondation ne nécessitant pas la protéine CeDVC1. La diminution du nombre de progénitures dans les mutants *CeDVC1*, est cependant mal comprise et pourrait résulter de défaut pendant la gamétogénèse. Par ailleurs, cette même étude a également démontré qu'une exposition aux UV de jeunes larves induisait une létalité embryonnaire (Mosbech *et al*, 2012). Ceci pourrait induire des pontages covalents entre l'ADN et des protéines de la chromatine de leur sperme, n'étant pas présents naturellement. Des études supplémentaires devraient permettre de comprendre les perturbations qu'induisent ces expositions et pourraient faire progresser la compréhension de la fonction moléculaire de MH/Spartan.

II. Comment condenser les chromosomes parentaux au premier cycle zygotique?

Les travaux que j'ai effectués sur MH m'ont amené à m'interroger sur ce qui était nécessaire pour permettre une condensation normale des chromosomes à la mitose. J'ai donc cherché à comprendre ce qui était si spécifique aux chromosomes paternels lors de la fécondation. En essayant de reproduire le phénotype de *mh* par la déplétion de certains facteurs possiblement impliqués dans la condensation et la division correcte des chromosomes paternels, à défaut de mieux comprendre le rôle de MH à la formation du zygote, j'ai trouvé des phénotypes intéressants que j'ai souhaité vous présenter dans cette thèse.

La déplétion de protéines dans la lignée germinale chez la drosophile, a été difficile jusqu'à l'apparition d'une nouvelle génération d'ARN interférence, les *small hairpin RNA* (*shRNA*) modelés sur un microARN endogène, et de la disposition d'une grande collection de lignées transgéniques, les lignées TRiPs, exprimant des *shRNA* ciblant un grand nombre de gènes (Ni *et al*, 2011). L'utilisation d'ARN interférence, a ici été un réel avantage pour la caractérisation de la fonction de certaines protéines à la formation du zygote quand leurs mutants étaient létaux. Dans cette deuxième partie, j'ai décidé de vous présenter deux phénotypes induits par la déplétion d'un composant du complexe Condensine I : Cap-D2, ainsi que par celle d'une protéine du complexe ORC : ORC2.

II.1. Rôle de Cap-D2, un composant du complexe Condensine I, à la fécondation

Dans la caractérisation de la fonction de la protéine MH à la fécondation j'ai voulu savoir si la localisation des protéines du complexe Condensine pouvait être affectée dans ses mutants. Malheureusement, l'absence d'anticorps commerciaux déjà validés chez la drosophile ne m'a notamment pas permise d'étudier cette question. A défaut, j'ai cherché à savoir si la déplétion de Cap-D2, un des composant du complexe condensine I, dans la lignée germinale femelle, pouvait phénocopier le phénotype induit dans les chromosomes paternels des mutants *mh* à la fécondation.

De nombreuses études ont été entreprises pour comprendre le processus de condensation des chromosomes à la mitose. Dans l'embryon de drosophile par exemple, la sous-unité Cap-G, faisant partie du complexe Condensine I, a été décrite comme indispensable à la condensation et à la résolution des chromatides sœurs à la mitose (Dej *et al*, 2004). Dans des cellules en culture de drosophile (les cellules S2), bien que les chromosomes soient toujours capables de se compacter, la déplétion de Cap-D2 induit une morphologie et une division anormale des chromosomes, engendrant des ponts de chromatine (Savvidou *et al*, 2005).

A la première division du zygote, il paraîtrait étonnant que cette protéine soit uniquement requise pour la ségrégation des chromosomes paternels. Néanmoins, ses mécanismes de recrutement au niveau des deux jeux de chromosomes parentaux pourraient différer. En effet, dans le zygote de souris, des études ont montré que la protéine Cap-D2 était recruté grâce à la protéine AKAP95, un composant de l'interface matrice nucléaire-chromatine en interphase, uniquement dans le pronoyau femelle alors que son recrutement dans le pronoyau mâle était indépendant de cette protéine (Bomar *et al*, 2002). Ici, grâce à la déplétion de Cap-D2 dans la lignée germinale femelle, j'ai souhaité étudier l'implication de cette sous-unité du complexe Condensine I, dans la formation des chromosomes zygotiques et leur division, comme ce que j'ai pu faire avec la déplétion de la polymérase ϵ (présenté dans l'article de la première partie).

J'ai utilisé ici une lignée TRiP exprimant un *shRNA* ciblant l'expression de *Cap-D2* associée à un pilote fort spécifique de la lignée germinale femelle : *MTD-Gal4* (Staller *et al*, 2013). Les femelles résultantes de cette association, sont viables, pondent des œufs en

quantité normale mais sont totalement stériles quand elles sont fécondées par des mâles sauvages.

En récoltant des embryons précoces et en les marquant avec des anticorps anti-histones et anti-H4ac afin d'étudier la morphologie des chromosomes et de reconnaître le pronoyau mâle respectivement, j'ai pu constater que leur développement s'arrêtait très tôt. De façon remarquable, toutes les premières divisions que j'ai pu observer étaient défectueuses (Figure 15). Au cours de la formation du zygote, la première perturbation qui apparaît se trouve au niveau de la méiose femelle. En effet, la majorité des œufs fécondés montrent des défauts évidents des produits de méiose (Figure 15A). Il est difficile de savoir si tous les œufs observés présentent ces perturbations. Quand une télophase de méiose II montre 4 noyaux (Figure 15A) nous ne pouvons pas nous assurer que les divisions aient été équitables avec le marquage effectué. Il faudrait, pour s'en assurer, marquer par exemple les centromères en détectant Cid, pour estimer le nombre chromosomes de chaque produit de méiose.

A la première division zygotique, l'aspect du pronoyau mâle paraît systématiquement normal comparé à la situation sauvage contrairement au pronoyau femelle qui arbore parfois des défauts flagrants (noyau fragmenté en plusieurs noyaux) (Figure 15B). A la première métaphase, j'ai pu constaté que les chromosomes parentaux se compactaient. Bien que leur morphologie ne soit pas totalement normale par rapport à des embryons contrôles, nous n'observons pas de défauts majeurs de condensation (Figure 15B), comme c'est le cas dans les embryons déplétés en polymérase ϵ ou au niveau des chromosomes paternels des œufs *mh*. Ensuite, la ségrégation des chromosomes parentaux est systématiquement anormale et résulte en la formation de pont de chromatine en télophase (Figure 15B). Sachant que la méiose femelle est fortement affectée par la déplétion de Cap-D2, et que le pronoyau femelle est souvent anormal (Figure 15A et B), nous pouvons nous demander si le pont de chromatine engendré, pourrait être uniquement dû aux chromosomes maternels, puisqu'aucune anaphase n'a pu être observée avec ce marquage. Des images produites lors d'une autre expérience nous montrent clairement une division anormale des chromosomes paternels en plus des maternels (Figure 15C).

Ces expériences, suggèrent donc que Cap-D2 est impliquée dans la première division zygotique pour les deux jeux de chromosomes. Leur ségrégation à la première mitose de l'embryon, nécessiterait donc cette sous-unité du complexe Condensine I, comme c'est certainement le cas dans toutes les autres cellules somatiques. Cependant, de façon

surprenante, la déplétion de cette protéine n'engendre pas de défauts majeurs dans la morphologie des chromosomes parentaux, suggérant que la formation de « bâtonnets » n'est pas engendré par l'action de cette protéine mais qu'elle pourrait en revanche permettre la résolution des deux chromatides sœurs. En outre, cette protéine est très importante sinon indispensable pour la méiose femelle. La méiose femelle est une division particulière, où chez la drosophile, les chromosomes se condensent d'une manière singulière, ne présentant pas vraiment de structure en bâtonnet mais sont plutôt individualisés avec une forme sphérique. Il serait intéressant de comprendre à quel moment le processus de méiose est affecté et notamment d'étudier la condensation du karyosome, le noyau de l'ovocyte en prophase de méiose I. En effet, il a été démontré que la perturbation de la recombinaison homologue lors de la méiose femelle chez la drosophile, s'accompagnait d'un défaut de condensation de ce noyau ainsi que de la perte localisation de Cap-D2 (Lancaster *et al*, 2010). La déplétion de Cap-D2 pourrait donc affecter la structure du noyau de l'ovocyte très tôt pendant l'ovogénèse, ce qui serait délétère pour la suite de la méiose femelle. Ces études pourraient permettre d'avancer dans la compréhension de la formation des chromosomes en mitose par les complexes Condensines. Néanmoins, comme ce sont des études préliminaires, il faudrait, avant toutes choses vérifier que le *shRNA* engendre bien une déplétion de la protéine Cap-D2.

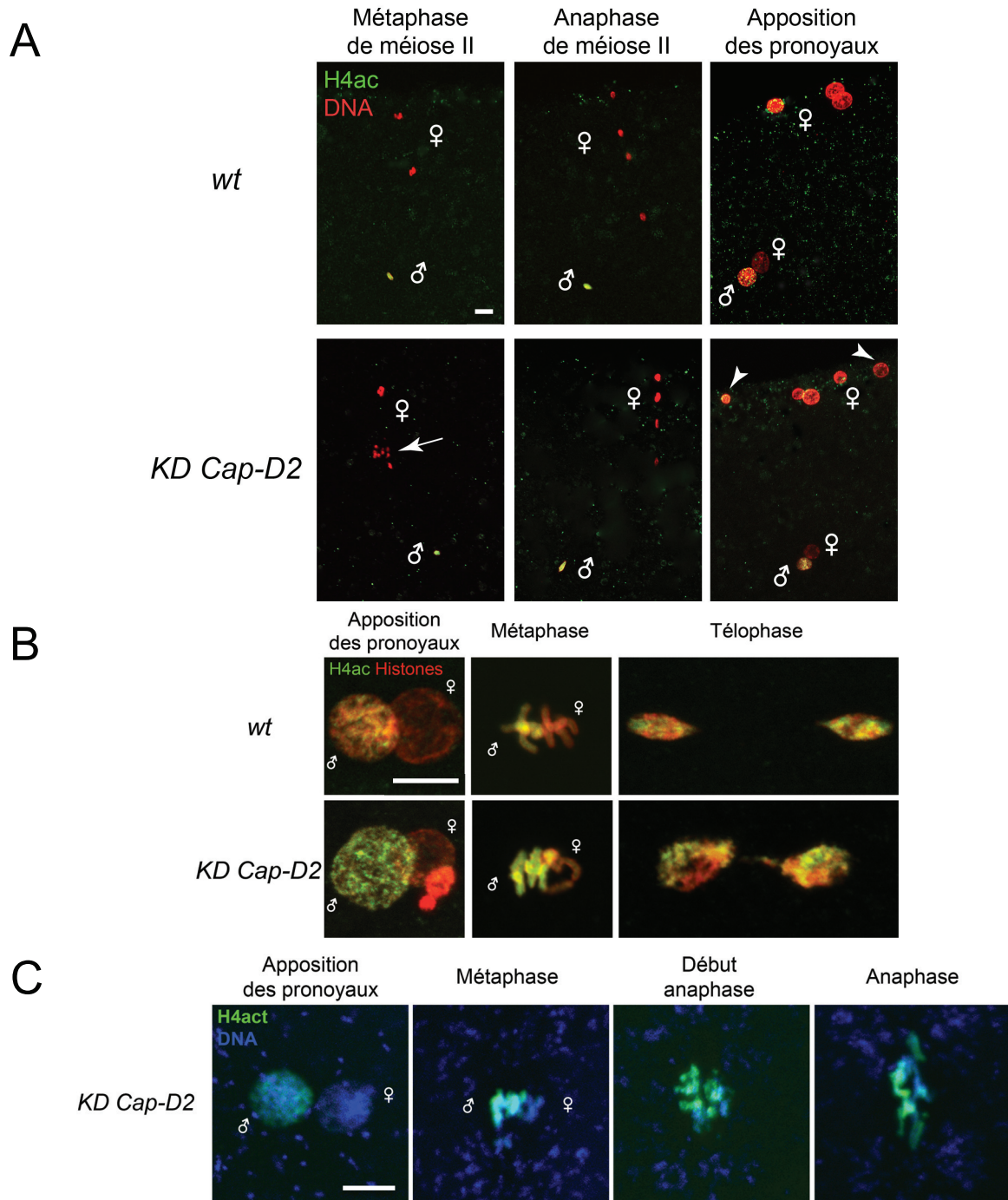


Figure 15: Phénotype induit par la déplétion de CAP-D2

Images confocales d'œufs issus de femelles sauvages (*wt*) ou *UAS-shRNA-Cap-D2/MTD-Gal4* (*KD Cap-D2*). La chromatine est marquée avec un anticorps anti-histones (rouge) (A) et (B), ou l'ADN est marqué avec du DRAQ5 (bleu) (C), et le pronoyau mâle est reconnu grâce au marquage anti-H4 acétylé (vert). Les stades sont indiqués en haut des images et les pronoyaux mâles et femelles sont notés avec des symboles.

(A) Vu large d'œufs fécondés montrant la fin de la méiose femelle et l'apposition des deux pronoyaux. Dans les embryons déplétés en Cap-D2, la méiose femelle paraît anormale (flèche) et résulte parfois en la production de globules polaires surnuméraires (têtes de flèches).

(B) A la première division zygotique, les chromosomes parentaux des embryons déplétés en Cap-D2 ne parviennent pas à se ségréger correctement et ne montrent pas de défauts de condensation clairs.

(C) La chromatine paternelle ne parvient pas à se diviser comme celle d'origine maternelle dans les embryons *KD Cap-D2*. Les points d'ADN autour des noyaux correspondent à *Wolbachia*.

Barre: 10µm

II.2. La sous-unité 2 du complexe ORC est dispensable pour la ségrégation des chromosomes paternels

II.2.a. Contexte de l'étude

Il a été établi que la perturbation de la réplication pouvait affecter la morphologie des chromosomes (Prasanth *et al*, 2004; Pflumm & Botchan, 2001; Loupart *et al*, 2000). Notre hypothèse principale expliquant la condensation anormale des chromosomes paternels dans les mutants *mh*, est que la réplication de son génome est incomplète. Pendant ma thèse, j'ai donc cherché à savoir, en dehors des lésions d'ADN au sens large, ce qui pouvait affecter la réplication sans pour autant l'inhiber totalement. En outre, je me suis également demandée si les mécanismes de réplication pouvaient différer entre le pronoyau mâle et femelle. Ces réflexions m'ont amené à m'intéresser à la mise en place des complexes de pré-RC et à l'activation des origines de réplication.

L'activation des origines de réplication est permise par le complexe ORC (*Origin Recognition Complex*). Il a été démontré que ce complexe est très important pour l'initiation de la réplication, en se liant aux origines de façon dépendante de l'ATP (Bell & Dutta, 2002; Bell & Stillman, 1992). ORC permet ensuite de recruter les acteurs qui autoriseront la synthèse de l'ADN : Cdc6, Cdt1 et le complexe d'hélicases Mcm2-7 (Wu *et al*, 2014). Contrairement aux levures, chez les eucaryotes supérieurs, la mise en place des complexes de pré-RC est indépendante de la séquence d'ADN (Schepers & Papior, 2010; Vashee *et al*, 2003). Les mécanismes de recrutement de ORC sur la chromatine, sont encore mal compris. En général, ce complexe est retrouvé dans des régions ouvertes de la chromatine et sa présence est souvent associée à celle de l'histone H4 acétylée (Miotto & Struhl, 2010 ; Hartl *et al*, 2007). Chez la drosophile, l'étude à l'échelle du génome, des éléments fonctionnelles de la chromatine, modENCODE, a permis de corréler la localisation de ORC avec des régions actives ainsi qu'avec celles extrêmement occupées par des cibles (ou *hotspots*) (Roy *et al*, 2010). De façon dynamique, il a été établi que le complexe ORC se localisait au niveau de la chromatine dès l'anaphase, jusqu'à la phase de réplication suivante, et disparaissait en métaphase. La mise en place des origines de réplication se fait donc bien en amont de la synthèse de l'ADN (Baldinger & Gossen, 2009; Loupart *et al*, 2000).

L'établissement des complexes de pré-RC pendant la formation du zygote est totalement inconnu. Dans cette situation particulière, l'état de la chromatine est complètement différent entre les deux pronoyaux parentaux. Il est également bien admis que pendant les premières divisions syncytiales de l'embryon de drosophile, il n'existe pas d'hétérochromatine à proprement parler (c'est à dire avec HP1 localisé au niveau des régions péricentromériques), et que l'activité de transcription est totalement absente. Les facteurs qui gouverneraient habituellement la répartition des complexes ORCs, ne peuvent donc pas s'appliquer ici, et leurs mécanismes pourraient être différents entre les deux pronoyaux parentaux.

De façon intéressante, des études ont montré que des mutations de certaines sous-unités du complexe ORC, induisaient des défauts de condensation des chromosomes dans les neuroblastes des larves de drosophile. Ce phénotype serait engendré par une perturbation de la réplication qui n'est cependant pas totalement abolie (Pflumm & Botchan, 2001; Loupart *et al*, 2000).

Dans cette partie je souhaite vous présenter une étude que j'ai pu commencer pendant ma thèse, sur la fonction de la protéine ORC2 lors de la formation du zygote. Je montre ici que bien que se localisant au niveau des deux pronoyaux, de façon surprenante, au premier cycle zygotique, cette protéine serait uniquement requise pour la division des chromosomes maternels. Par conséquent, cette étude, qui va à l'encontre des connaissances actuelles, nous questionne sur la régulation de la réplication et la structure unique de la chromatine paternelle pouvant se passer de ORC2 pour la première phase S.

II.2.b. Résultats

Les femelles déplétées en ORC2 dans la lignée germinale sont stériles.

Afin d'étudier le rôle du complexe ORC au cours du premier cycle zygotique, j'ai déplété la sous-unité ORC2 à l'aide d'une lignée TRiP permettant d'exprimer un *shRNA* ciblant une séquence du troisième exon du gène. Plusieurs pilotes s'exprimant plus ou moins fortement dans la lignée germinale femelle ont été testés pour induire son expression (*MTD-Ga4*, *Nos-Gal4* ou *Cog-Gal4*) et la fertilité des femelles a ensuite été évaluée. Les résultats

des tests de fertilité des femelles résultantes de cette association, sont présentés dans la Figure 16A. Le pilote fort *MTD-Gal4* ainsi que *Nos-Gal4* (un peu moins fort), engendre une stérilité femelle totale quand elle sont fécondées par des mâles sauvages. Le pilote faible *Cog-Gal4*, quant à lui, ne provoque qu'une diminution de leur fertilité. Dans tous les cas, ces femelles pondent des œufs en quantité normale et d'aspect normal, suggérant que *ORC2* est nécessaire au développement des œufs pondus.

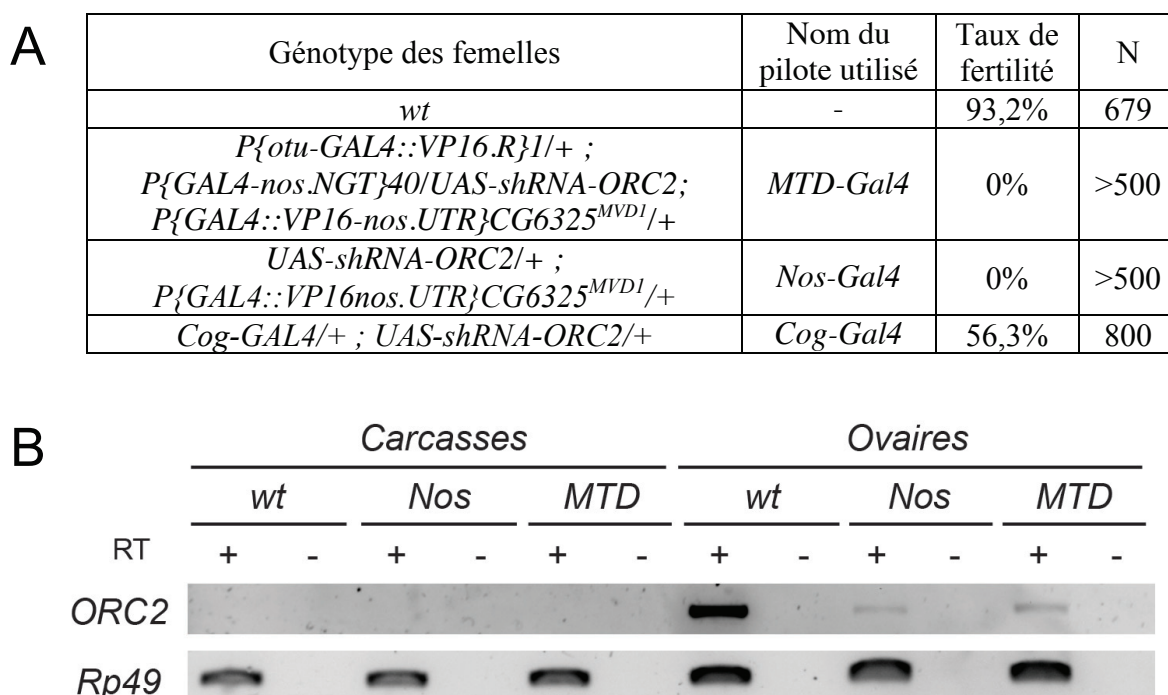


Figure 16: La déplétion des transcrits de *ORC2* dans la lignée germinale femelle s'accompagne d'une stérilité femelle

(A) Table récapitulant les tests de fertilité effectués avec des femelles exprimant le *shRNA* ciblant *ORC2* avec différents pilotes, croisées avec des mâles contrôles (*w¹¹¹⁸/Y*). Le génotype des femelles est indiqué ainsi que le nom couramment utilisé du pilote employé. Les pilotes forts *MTD-Gal4* et *Nos-Gal4* engendrent une stérilité totale.

(B) Analyse de RT PCR semi-quantitative sur l'efficacité du *shRNA* ciblant *ORC2*. La quantité de transcrits *ORC2* est nettement réduite dans les ovaires par l'expression du *shRNA* avec les pilotes *Nos-Gal4* (*Nos*) et *MTD-Gal4* (*MTD*) (génotypes exacts défini en (A)) comparés aux ovaires sauvages (*wt*). L'expression du gène *Rp49* a été utilisée comme contrôle.

Dans le but d'évaluer l'efficacité du *shRNA* dans la lignée germinale femelle, des RT-PCR ont été faites, dans des ovaires et des carcasses de femelles exprimant le *shRNA* ciblant *ORC2*, avec les pilotes forts : *MTD-Gal4* et *Nos-Gal4*. Les résultats présentés en Figure 16B, ne montrent aucun signal du transcrit dans toutes les carcasses ce qui peut être expliqué par le peu de cellules en division et qui doivent donc se répliquer dans les mouches adultes. En revanche, ils permettent d'observer une diminution très importante de la quantité de transcrits présents dans les ovaires exprimant le *shRNA* indiquant une inhibition de l'expression de *ORC2* efficace. Toutefois, un léger signal reste encore visible reflétant soit, des transcrits persistants dans la lignée germinale femelle, soit, l'expression de *ORC2* des cellules folliculaires ne synthétisant pas le *shRNA*. En effet, les follicules ovariens de drosophile se composent d'une partie germinale (l'ovocyte et les cellules nourricières), et d'une partie somatique (les cellules folliculaires) qui permettent la formation de la membrane vitelline et du chorion. L'amplification des gènes de *ORC2* nécessite d'ailleurs le complexe ORC (Royzman *et al*, 1999). Comme le pilote *MTD-Gal4* engendre une diminution importante de la quantité de transcrits, j'ai décidé de l'utiliser pour dépléter *ORC2* dans la suite des résultats présentés.

ORC2 est nécessaire à la ségrégation des chromosomes maternels à la première division

Dans le but de mieux comprendre la stérilité induite par la déplétion de *ORC2* chez les femelles, j'ai récolté des embryons précoces, et les ai marqués avec un anticorps anti-H3K27me2, qui est uniquement présent dans la chromatine maternelle. Dans ces embryons, aucun premier cycle ne se déroule correctement et fini toujours par former un pont de chromatine en télophase (Figure 17A et B). Ces ponts, observés dès l'anaphase, sont chaque fois marqués par H3K27me2 suggérant que seule la chromatine maternelle est affectée. Afin de vérifier que les chromosomes paternels parviennent à se diviser correctement, j'ai également procédé à un marquage anti-H4 acétylé, qui permet de reconnaître la chromatine paternelle au premier cycle. De façon surprenante, dans chaque anaphase observée, j'ai clairement pu montrer que les chromosomes paternels se divisaient correctement (Figure 17C). Il est également à noter que la méiose femelle ne semble pas affectée par la déplétion de *ORC2* (non montré).

La forte diminution ou l'absence de *ORC2*, devrait entraîner une perturbation de la réplication. Chez la drosophile, les mutants de *ORC2* ou *ORC5* arborent un phénotype

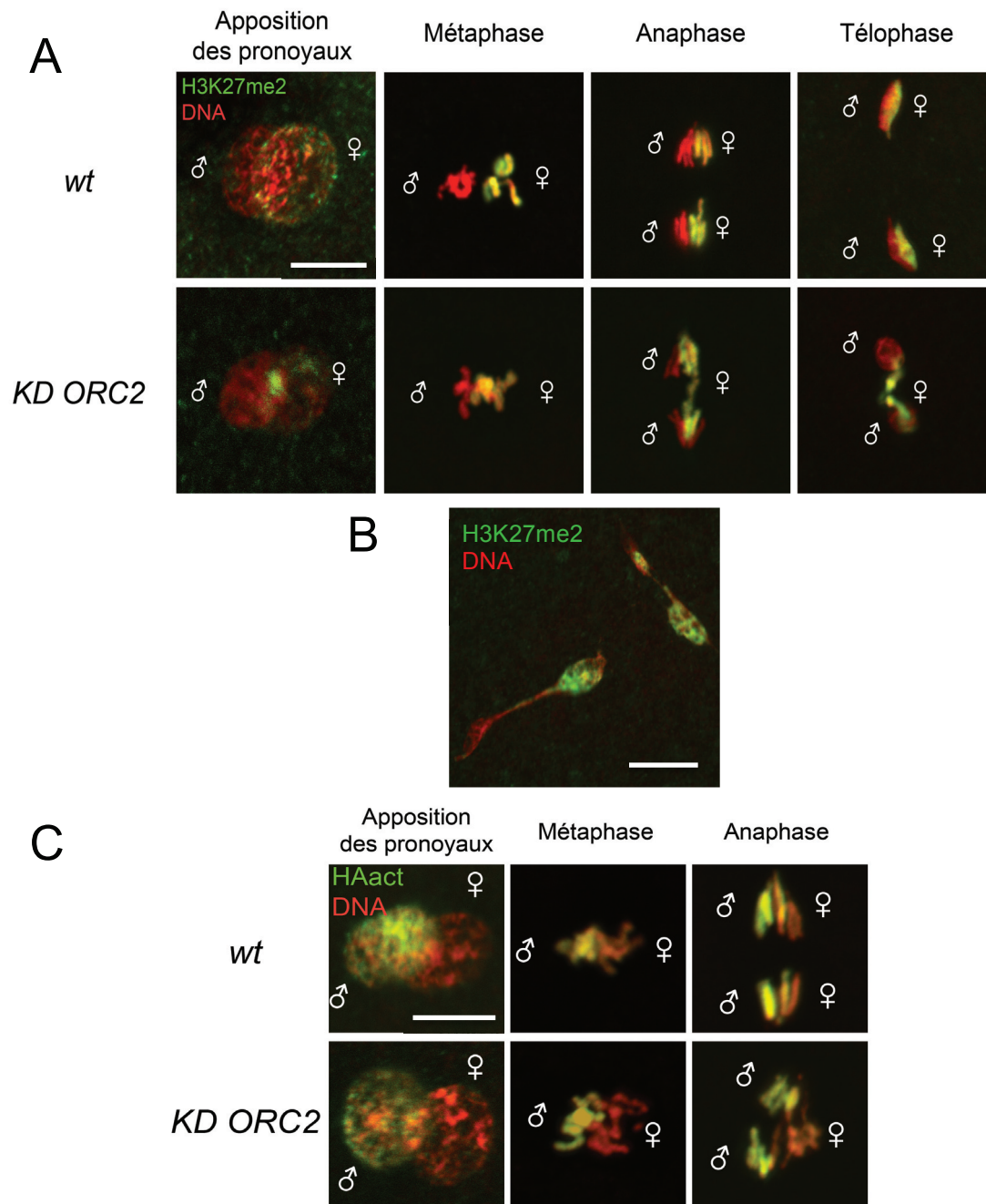


Figure 17: Phénotype induit par la déplétion en ORC2 dans la lignée germinale femelle.

Images confocales d'œufs issus de femelles sauvages (*wt*) ou *UAS-shRNA-ORC2/MTD-Gal4* (*KD ORC2*). Les stades sont indiqués. La chromatine paternelle et maternelle est notée avec des symboles. L'ADN est marqué avec du iodure de propidium (rouge).

(A) et (B) La chromatine maternelle est reconnue avec un marquage anti-H3K27me2 (vert). A la première division de l'embryon, la chromatine maternelle ne parvient pas à se diviser (A) et les divisions successives sont systématiquement défectueuses (B).

(C) La chromatine paternelle est reconnue grâce à un marquage anti-H4 acétylé (H4act). Celle-ci se divise normalement à la première division zygotique.

Barre : 10µm

comparable aux mutants *PCNA* et *Mcm4* avec un défaut de condensation, suggérant un lien direct entre condensation des chromosomes et réplication (Pflumm & Botchan, 2001). De plus, il a été démontré que l'absence de ORC2 ou de ORC5 entraîne une forte diminution ou une anormale distribution de l'incorporation de l'analogue de thymidine BrdU (Prasanth *et al*, 2004; Pflumm & Botchan, 2001; Loupart *et al*, 2000). De même, la déplétion de ORC2 affecte fortement la localisation de PCNA chez l'Homme. Afin de tester si la réplication du génome maternel est affectée dans les embryons déplétés en ORC2, j'ai étudié la localisation et la dynamique de PCNA. Ici, comme dans les embryons sauvages ou déplétés en ADN polymérase ϵ , ce marquage n'est pas affecté ce qui diffère avec ce qu'il a été décrit chez l'Homme (Figure 18A). Cependant, nous savons que la dynamique de PCNA, peut ne pas nous renseigner sur l'éventuelle perturbation de la réplication. Grâce aux embryons déplétés en ADN polymérase ϵ , nous avons pu lier le défaut de synthèse d'ADN avec la condensation irrégulière des chromosomes (article de la première partie). Au premier abord, la diminution ou l'absence de ORC2 n'affecte pas clairement la morphologie des chromosomes maternels. Dans le but d'évaluer l'état de leur condensation, j'ai effectué un marquage anti-histones qui permet de mieux observer leur morphologie. J'ai pu constater que la déplétion de ORC2, n'engendrait pas de défauts de condensation majeurs, puisque les bras des chromosomes maternels restent définis avec ce marquage (Figure 18B). Ces résultats ne nous éclairent donc pas quant à l'état de la réplication, ni ne nous renseignent sur la raison pour laquelle les chromosomes maternels sont incapables de se diviser à la première division zygotique. Néanmoins, à la fécondation, ORC2 n'est pas indispensable à la condensation des chromosomes maternels contrairement à ce qui peut être le cas pour MH avec les chromosomes paternels (article ci-dessus).

Ainsi, ces résultats indiquent que la déplétion de ORC2 affecte la division des chromosomes maternels, mais ne nous permet pas de statuer quant à l'état de leur réplication. En revanche, de façon remarquable, l'équivalent paternel, semble pouvoir s'accommoder de l'absence ou de la forte diminution de ORC2 d'origine maternelle, à la première division uniquement.

Dans la chromatine paternelle, ORC2 n'est pas transmise par spermatozoïde

Sachant que dans les cellules eucaryotes, le complexe ORC est requis pour la réplication du génome, il paraît surprenant que le pronoyau mâle puisse dupliquer son ADN

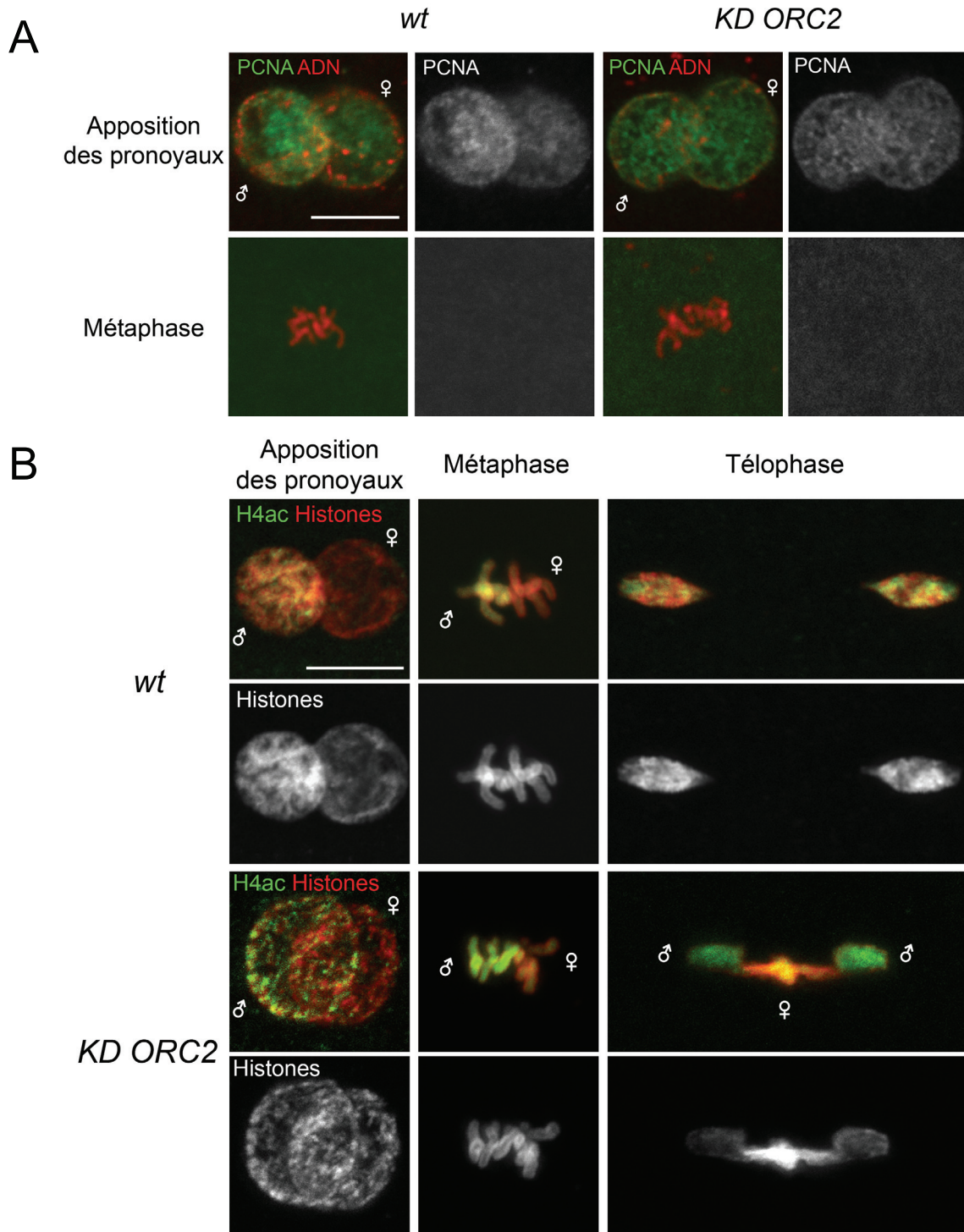


Figure 18: Réplication et condensation des chromosomes parentaux dans les embryons déplétés en ORC2

Images confocales d'œufs issus de femelles sauvages (*wt*) ou *UAS-shRNA-ORC2/MTD-Gal4* (*KD ORC2*). Les stades des images sont indiqués. La chromatine paternelle et maternelle sont notées avec des symboles.

(A) L'ADN est marqué avec du iodure de propidium (rouge) et PCNA est en vert. PCNA n'est détecté que pendant la réplication dans les deux génotypes.

(B) La chromatine est marquée avec un anti-histones (rouge) et les chromosomes paternels sont reconnus grâce à un marquage anti-H4 acétylé (H4act) (vert). En métaphase, pas de défaut majeur de condensation des chromosomes n'est observé.

Barre : 10µm

sans encombre, avec peu ou pas d'ORC2. De plus, nous pouvons noter que, même si les chromosomes paternels parviennent à se diviser dans ces conditions, la formation d'embryons haploïdes androgénétiques n'est jamais observée, ni même quelques divisions haploïdes succédant la première mitose (Figure 17B). Ceci suggère que, dès la deuxième division, la chromatine paternelle nécessite l'apport de ORC2 maternelle. Ces observations pourraient s'expliquer par la transmission de cette protéine par le noyau du spermatozoïde. En effet, dans les cellules somatiques, ORC2 est chargée sur la chromatine bien avant la réplication, pendant l'anaphase du cycle précédent. Il ne paraît donc pas impossible que cette protéine soit déjà dans le noyau du sperme bien avant la fécondation. Pour savoir si c'est effectivement le cas, j'ai utilisé une lignée transgénique exprimant ORC2 fusionnée à la GFP en N-terminale, qui sauve la létalité induite par sa mutation, indiquant la fonctionnalité de la protéine modifiée. J'ai regardé dans les testicules entiers de ces drosophiles la distribution et la dynamique de ORC2 pendant la spermatogénèse. GFP::ORC2 ne semble présente qu'au moment de la réplication des spermatogonies, avant la méiose, mais n'est pas détectée dans les spermatocytes ni les spermatides (Figure 19A). Afin de vérifier l'absence de GFP::ORC2 dans les spermatides, j'ai également procédé à un étalement de testicules. Là encore, contrairement à la protéine GFP::K81 utilisée comme contrôle, aucun signal de GFP::ORC2 n'a pu être détecté (Figure 19B), suggérant que les spermatozoïdes matures ne retiennent pas cette protéine à l'issue de la spermiogénèse.

ORC2, se localisant dans le pronucleus mâle, serait dispensable à la division des chromosomes paternels

Si ORC2 est absente du spermatozoïde mature, mais que le pronoyau mâle seul peut s'accommoder de sa déplétion à la formation du zygote, nous pourrions nous attendre à une distribution asymétrique de ce composant, pendant le premier cycle. Les deux pronoyaux étant très différents, l'initiation de la réplication pourrait être prise en charge par un autre complexe ou une autre protéine, dans la partie paternelle. Afin de tester cette hypothèse, j'ai étudié la localisation de GFP::ORC2 dans des œufs fécondés ou dans les embryons précoces. De façon remarquable, la protéine, absente des noyaux à la deuxième métaphase de la méiose femelle, se localise clairement dans le pronoyau mâle ainsi que dans les produits de méiose, à la fin de celle-ci (Figure 20). GFP::ORC2 est ensuite détectable dans les deux pronoyaux à la

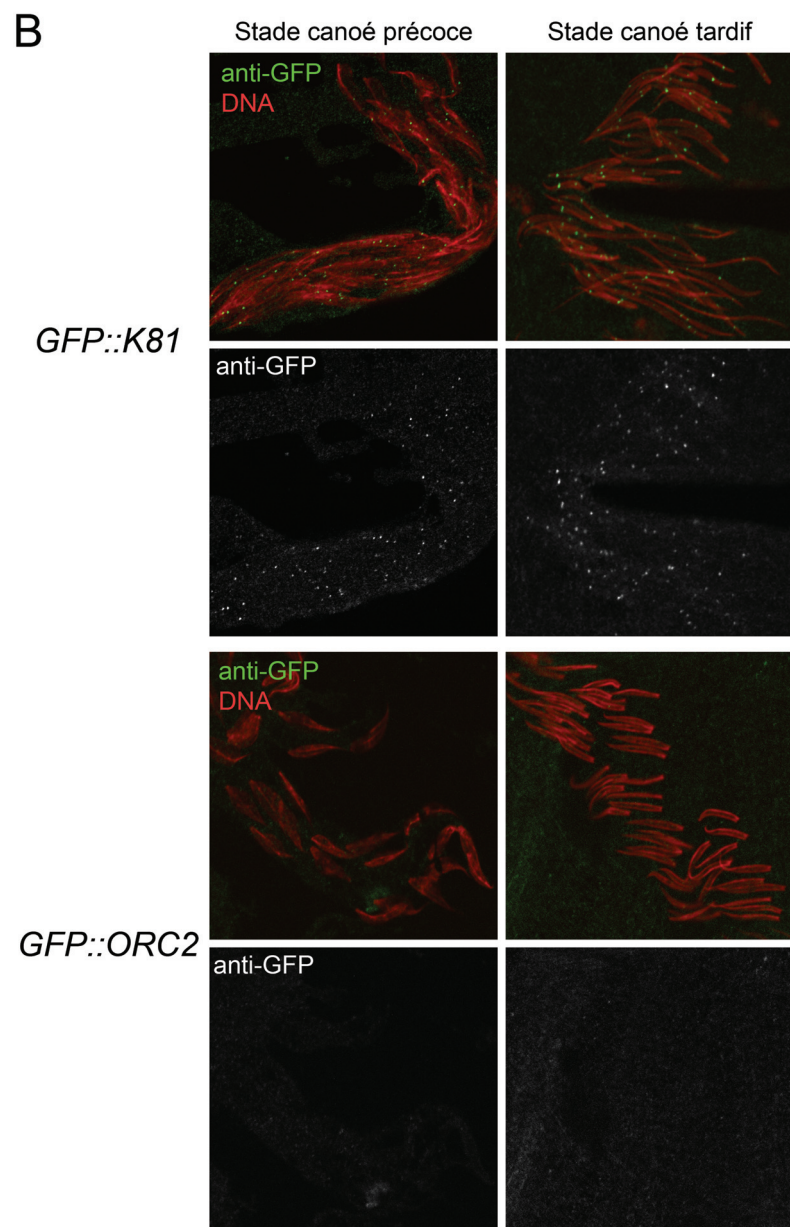
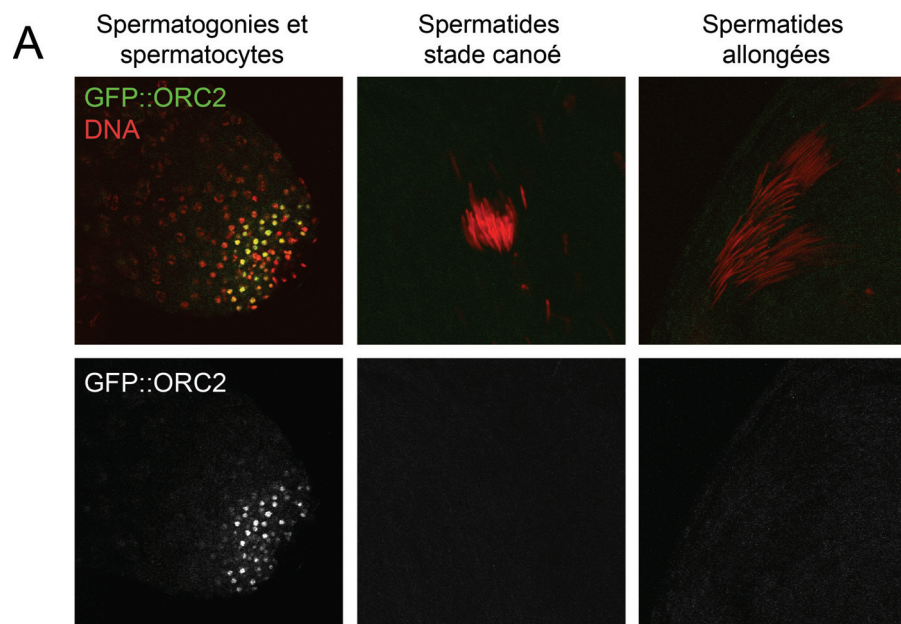


Figure 19 : GFP::ORC2 n'est pas présente dans les spermatides

Images confocales de testicules, aux stades de spermatogénèse indiqués. L'ADN est marqué avec du iodure de propidium (rouge)

(A) Testicules entiers de mâles *GFP::ORC2 ; ORC2^{γ4} / ORC2^l* (*GFP::ORC2*) où la GFP est détectée de façon native sans immuno-marquage. GFP::ORC2 (vert) est détectée dans les testicules uniquement dans les spermatogonies (à gauche). Au cours de la spermiogenèse, après la méiose, aucun signal n'est observé (les deux images à droite).

(B) Testicules étalés de mâles *GFP::ORC2 ; ORC2^{γ4} / ORC2^l* (*GFP::ORC2*) ou *GFP::K81 ; K81²* (*GFP::K81*) marqués avec un anticorps anti-GFP (vert). GFP::K81 est utilisé comme contrôle positif. Cette expérience confirme l'absence de GFP::ORC2 détectable dans les spermatides.

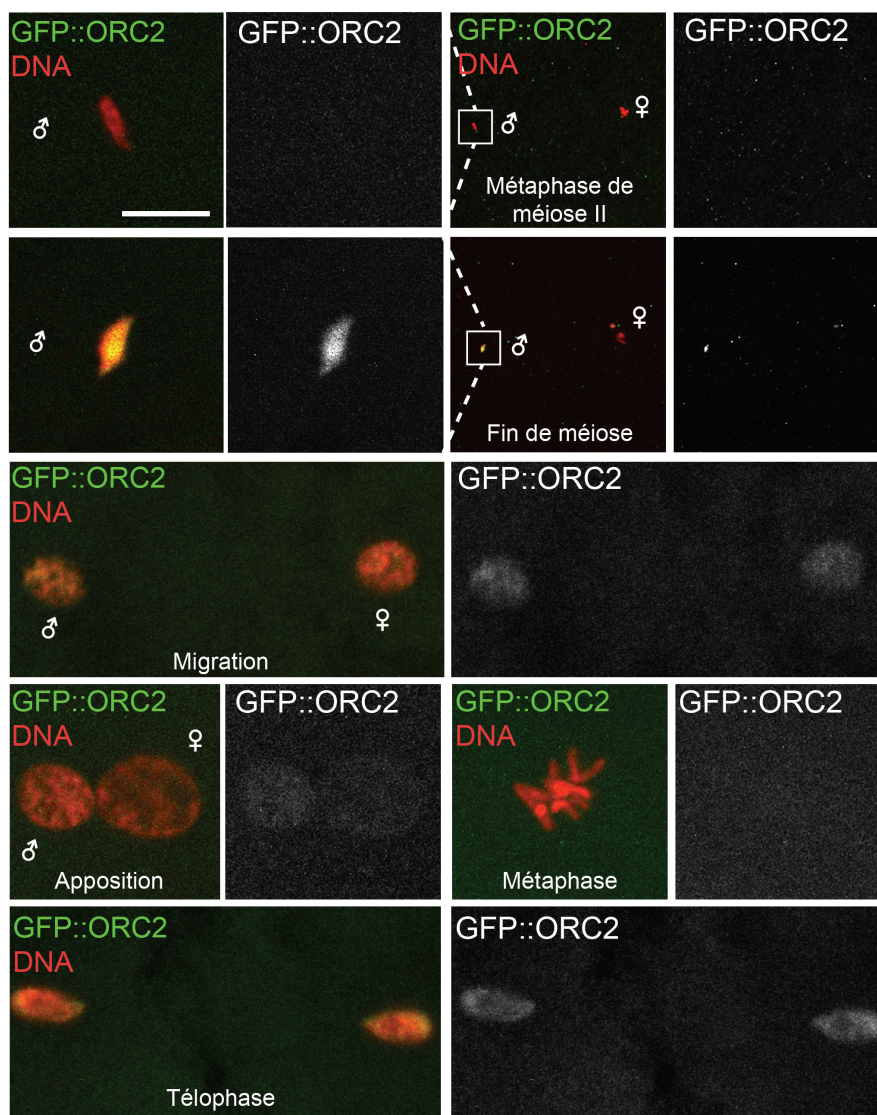


Figure 20: GFP::ORC2 se localise au niveau des deux pronoyaux à la fécondation

Images confocales d'œufs issus de femelles *GFP::ORC2 ; ORC2^{γ4}/ORC2^l* aux stades indiqués. Les pronoyaux mâles et femelles sont indiqués par des symboles. L'ADN est marqué avec du iodure de propidium (rouge) et la GFP est détectée grâce à un anticorps anti-GFP.

Barre : 10µm

migration du pronoyau femelle, pendant le début de la réplication, et disparaît après l'apposition. Comme ce qui est décrit dans la littérature, la protéine se charge de nouveau sur la chromatine à la fin de la mitose (Figure 20). Étonnamment, ces résultats suggèrent que ORC2, normalement présent dans le pronoyau mâle, n'est cependant pas nécessaire à la division des chromosomes paternels au premier cycle du zygote.

II.2.c. Discussion :

L'échec de la ségrégation des chromosomes maternels serait engendré par la déplétion de ORC2

Bien que cette étude ne soit pas complète, la déplétion de ORC2 dans la lignée germinale femelle, engendre un phénotype inattendu, qui nous questionne sur les mécanismes de réplication du pronoyau mâle au cours de la formation du zygote. En effet, en condition normale, ORC2 se localiserait au niveau des deux pronoyaux parentaux mais ne serait indispensable que pour la réplication du génome maternel.

Les RT-PCR faites avec des ovaires exprimant le *shRNA* ciblant *ORC2* nous ont montré une diminution efficace des transcrits. Cependant, il faudrait vérifier que le phénotype engendré, est bien spécifique de la déplétion de ORC2. L'idéal, serait de le sauver par l'addition de la protéine sauvage de façon exogène. Le problème ici, est que le *shRNA* cible une séquence dans le troisième exon du gène. Apporter une copie exogène serait donc inutile, puisque qu'elle serait également affectée par interférence à l'ARN. A défaut, ce que nous pourrions entreprendre, c'est de combiner l'expression du *shRNA* dans la lignée germinale femelle avec le transgène *GFP::ORC2*. L'interférence à l'ARN ciblerait effectivement la protéine fusion ce qui devrait provoquer le phénotype décrit ci-dessus, accompagné de la disparition du signal *GFP::ORC2*. Une autre alternative pour vérifier que la déplétion de ORC2 dans la lignée germinale femelle, engendre l'incapacité des chromosomes maternels à se diviser, serait de dégrader directement la protéine *GFP::ORC2* en contexte mutant pour ORC2. Pour cela, nous pouvons utiliser deGradFP, dont le principe est la déplétion d'une protéine fusionnée à la GFP, par l'expression d'une *ubiquitin ligase* spécifique à la GFP avec le système UAS-Gal4. deGradFP nous permettrait donc de dépléter la seule source de ORC2

(ici fusionnée à la GFP) par un autre moyen que le *shRNA* dans la lignée germinale femelle et de pouvoir vérifier cette déplétion par immunofluorescence qui devrait engendrer l'incapacité des chromosomes maternels à se diviser.

La déplétion de ORC2 pourrait uniquement affecter la réplication du pronoyau femelle

Sachant que ORC2 a été mis en évidence pour être nécessaire à la réplication, nous nous attendons à ce que la ségrégation défectueuse des chromosomes maternels soit engendrée par la perturbation de la réplication. Néanmoins, la dynamique de PCNA ainsi que la morphologie de ces chromosomes n'étant pas clairement affectés, rien ne nous prouve que ce soit la synthèse de l'ADN qui soit en cause ici. Pour s'en assurer, l'expérience adéquate serait l'évaluation de l'incorporation d'un analogue de thymidine comme l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine). Bien que j'aie pu mettre au point l'expérience d'incorporation d'EdU dans les embryons précoces au cours de la caractérisation de *mh*², en nourrissant les femelles avec de la levure supplémentée par ce composant, cette expérience reste très inefficace. En effet, moins de 10% des embryons en incorporent, alors que la plupart des cellules nourricières des follicules ovariens sont marqués. De plus, quand les chromosomes sont marqués positivement pour l'EdU, il est très difficile de quantifier le niveau d'incorporation parce que, (i) le marquage est très faible, et (ii) parce que le nombre d'embryons positifs au bon stade est extrêmement restreint, ne permettant pas d'en avoir un nombre significatif, même après plusieurs semaines de récolte.

Afin de vérifier que le *shRNA* utilisé affecte la réplication nous pourrions, dans un premier temps, s'assurer que la déplétion d'ORC2 affecte la synthèse d'ADN au niveau des gènes de chorion. En effet, dans les cellules folliculaires, les noyaux sont entièrement dupliqués puis, les gènes de chorion sont répliqués un grand nombre de fois pour leur permettre une très forte expression. Il a été démontré que ORC2 est requise pour l'amplification de ces gènes (Austin *et al*, 1999; Landis *et al*, 1997). En ciblant l'expression du *shRNA* dans les cellules folliculaires, grâce à des pilotes spécifiques tels que *C135-Gal4*, nous pourrions évaluer l'inhibition de la réplication induite par la déplétion de ORC2, à l'aide du niveau d'incorporation d'EdU. Ces follicules ovariens devraient aussi s'effondrer sur eux-mêmes, si les gènes de chorion ne sont pas amplifiés au moment de sa synthèse.

La chromatine paternelle pourrait se passer de ORC2 pour la première réplication

Chez les eucaryotes supérieurs, les études suggèrent que le complexe ORC est indispensable pour la réplication. Pourtant, il semblerait que le génome paternel puisse très bien se passer de la sous-unité 2 du complexe pour se répliquer. Néanmoins, pour confirmer de ce résultat, il faudrait s'assurer que les mâles étant déplétés en ORC2 pendant la spermiogénèse, soient toujours fertiles. En effet, on peut toujours soupçonner la présence de cette protéine dans les spermatides dans une quantité en deçà du niveau détectable par immunofluorescence. En utilisant des pilotes de la lignée germinale mâle, nous avons tenté de dépléter ORC2 et avons testé la fertilité des mâles. Aucune baisse de fertilité n'a été détectée, ne suggérant pas de rôle pour cette protéine pendant la spermatogénèse. Cependant, il faudrait confirmer cette donnée par des expériences de RT-PCR sur testicules.

Si tous les paramètres exposés ci dessus sont vérifiés, la question principale que pose cette étude est pourquoi et comment le pronoyau mâle peut-il se répliquer correctement en l'absence de ORC2 ? Pour répondre à ces questions il faut tout d'abord s'interroger sur les différences qu'il existe entre la chromatine paternelle et maternelle. Bien que la formation de l'hétérochromatine, par la présence de HP1 dans les régions péricentromériques, et de sa réplication tardive, n'apparaissent qu'à partir du cycle 14 (Shermoen *et al*, 2010), ses marques épigénétiques sont déjà présentes au premier cycle, dans le pronoyau femelle, comme la triméthylation de H3K9 (non montré). Chez les mammifères, il a aussi été démontré que la monométhylation de H4K20, marqueur de l'hétérochromatine constitutive, était uniquement présente dans le pronoyau femelle et que les régions portant cette marque étaient répliquées tardivement (Kourmouli *et al*, 2004). Il serait donc intéressant de savoir si cette marque est aussi présente dans le pronoyau femelle de la drosophile. Cependant, même si la réplication à ce stade, est connue pour être très rapide et ne pas avoir de régions répliquées tardivement, il n'est pas exclu que certaines zones du génome maternelle apportent certaines contraintes à la synthèse de l'ADN. La chromatine paternelle, quant à elle, est dépourvue de toutes ces marques et est donc considérée comme « naïve ». Il est donc peut être plus facile de la répliquer. En effet, si l'absence de ORC2 ne déstabilise pas tout le complexe ORC, mais qu'il le rend moins efficace, sans contrainte épigénétique, il pourrait être encore capable de répliquer convenablement le génome. De plus, ORC1 est la sous-unité la plus grande qui détient l'activité ATPase. Son expression ectopique induit la réplication (Asano & Wharton,

1999). Celle-ci pourrait donc encore être présente sur la chromatine et permettre, dans une certaine mesure, l'initiation de la réplication. Cependant, les études qui ont été menées sur les sous-unités de ORC ont montré que si l'une d'entre elles manquait sur la chromatine, les autres n'étaient plus capable de se localiser correctement (Park & Asano, 2008; Chesnokov, 2007). Il serait donc important de savoir si l'absence de ORC2 affecte la localisation des autres sous-unités et si la déplétion des composants du complexe, notamment ORC1, engendre le même phénotype.

Malgré tout, il existe une situation où le complexe ORC n'est pas requis pour la réplication : ce sont les endoréplifications. En effet, la déplétion de ORC1 n'affecte pas l'endoréplication des noyaux des glandes salivaires contenant les chromosomes polytènes (Loupart *et al*, 2000). Les auteurs émettent donc l'hypothèse qu'il pourrait exister un autre complexe ou une autre protéine qui permettrait de remplacer le complexe ORC pour l'endoréplication (Park & Asano, 2008). Les femelles exprimant le *shRNA* de *ORC2* dans leur lignée germinale pondent des œufs d'aspect normal et en quantité normale suggérant que l'ovogénèse n'est pas affectée par la déplétion de ORC2. Les noyaux des cellules nourricières étant endorépliqués, l'ovogénèse ne devraient donc pas être affectée. Néanmoins il faudrait vérifier que ces réplifications ne nécessitent pas ORC2 dans les follicules ovariens. En outre, des expériences *in vitro* ont aussi décrit que le complexe ORC n'était pas forcément indispensable à la réplication. Elles ont pu montrer que Cdc6 artificiellement chargée sur l'ADN, était capable d'initier et de réguler correctement la réplication, et ceci, même avec ORC1 tronquée (Takeda *et al*, 2005). Aussi, nous pouvons nous imaginer qu'il existe un autre facteur que ORC, qui permette le recrutement de Cdc6 pour permettre la réplication du pronoyau mâle. Cette protéine pouvant peut-être même être transmise par le spermatozoïde.

Cette étude est donc encore un exemple mettant en exergue la singularité de la chromatine paternelle. Elle pourrait aussi montrer que ORC n'est pas forcément indispensable à la réplication de l'ADN chez les eucaryotes supérieurs, dans d'autres situations que les endoréplifications.

Conclusion (Partie II)

La caractérisation de MH m'a amené à me questionner sur les facteurs indispensables à la condensation des chromosomes ainsi qu'à leur division. Grâce à cela, j'ai pu explorer le rôle de certaines protéines pour la formation du zygote. Les lignées TRiP ont pour cela été un merveilleux outil. Notamment, le *shRNA* ciblant le gène codant pour l'ADN polymérase ϵ a permis de révéler un phénotype similaire à celui retrouvé dans les œufs *mh*² mais touchant les deux jeux de chromosomes, reliant ensemble condensation irrégulière et défaut de réplication.

L'étude du rôle de Cap-D2 pour la première division, n'apporte pas vraiment d'éléments nouveaux quant aux mécanismes qui permettent d'acquérir une morphologie des chromosomes, adéquate à la division. Elle permet pourtant de montrer que le processus qui implique cette protéine, est commun aux deux pronoyaux malgré leur différence épigénétique. Egalement, la morphologie des chromosomes obtenus avec la déplétion de Cap-D2 étant différente de celle que l'on peut observer sur les chromosomes paternels de *mh*², cela suggère que la protéine MH n'intervient pas dans la résolution des chromatides à ce niveau.

L'étude du rôle de ORC2 lors de la formation du zygote, a en revanche, permis d'ouvrir de nouveaux horizons sur la formation des complexes de pré-RC, ainsi que sur la singularité de la chromatine paternelle. En regard de *mh*, le phénotype engendré par la déplétion de ORC2 et la localisation de cette protéine, nous permettent aussi, d'exclure une implication de MH dans l'activation des origines de réplication paternels. Néanmoins, cette caractérisation nous ouvre la possibilité, qu'en plus des divergences épigénétiques, il existe aussi différents mécanismes pour la formation des complexes de pré-RC entre les pronoyaux mâle et femelle.

CONCLUSION GENERALE

Si la division de la cellule est à la base de la vie, une est particulièrement importante pour l'existence des eucaryotes supérieurs : la division du zygote. Les mécanismes qui gouvernent la ségrégation des chromosomes dans les cellules somatiques sont déjà infiniment complexes, mais la division des deux pronoyaux ajoute encore un niveau de complexité.

Nous avons en effet pu voir que ces deux pronoyaux étaient singulièrement différents. La réplication, qui est un processus très conservé, nécessite dans presque toutes les situations le complexe ORC. Cependant, j'ai pu montrer que les mécanismes d'initiation de la synthèse d'ADN même, seraient différents entre la chromatine paternelle et maternelle et que le complexe ORC, indispensable pour la survie de la plupart des cellules, n'était pas requis pour la réplication du pronoyau mâle uniquement.

Au cours de ma thèse, je me suis également attelée à caractériser la fonction de MH. Dans les cellules somatiques, elle serait impliquée dans la voie du TLS comme ce qui a été montré chez l'Homme avec Spartan. Cette fonction ne serait par contre pas indispensable pour la survie des cellules. Une situation particulière où son rôle semble se distinguer des cellules somatiques, et est ici cruciale, est la formation du pronoyau mâle à la fécondation. MH serait en effet requise pour rendre ce noyau compatible avec la réplication. Il semblerait donc que le pronoyau mâle requiert des mécanismes bien spécifiques pour maintenir son intégrité pour qu'il soit capable d'intégrer le zygote, qui seraient inhérents à la conformation de l'ADN du sperme. Si la condensation du noyau du spermatozoïde joue un rôle majeur pour la fertilité des mâles, elle apporte néanmoins d'énormes contraintes à la fécondation.

La raison pour laquelle, ce projet m'a tant passionné tout au long de ces quelques années, est peut-être justement la difficulté de toucher du doigt, les mécanismes dans lesquelles la protéine MH était impliquée. Premièrement, la difficile accessibilité du stade auquel elle est indispensable, nous empêche de procéder à des expériences biochimiques dans ce contexte. Ensuite, il n'est certainement pas impossible que les connaissances actuelles, ainsi que les outils disponibles ne permettent pas encore de pouvoir décrypter la fonction moléculaire de MH. Finalement, le mutant, isolé il y a déjà presque 40 ans, nous permettra possiblement, de mettre en évidence des nouveaux processus permettant de maintenir un génome intègre. D'un côté ces travaux peuvent être importants pour mieux comprendre certains problèmes de stérilité ainsi que pour progresser dans l'efficacité des fécondations médicalement assistées ; de l'autre, ils peuvent aussi donner des clefs pour l'étude des mécanismes de maintenance de l'intégrité du génome au cours des cycles cellulaires.

Quoi qu'il en soit, la caractérisation de la fonction de MH, bien que semée d'embûches, ne peut être que bénéfique pour évoluer dans la compréhension des processus gouvernant la formation du zygote. Cette thèse, semble en être un bon exemple puisqu'elle a notamment permis de mettre à jour d'autres problématiques insoupçonnées, comme l'activation des origines de réplication dans le zygote de drosophile.

MATERIELS ET MÉTHODES

Lignées de drosophiles

Les mouches ont été élevées à 25°C sur un milieu standard. La lignée w^{118} a été utilisée comme contrôle (*wt*). Les lignées de drosophile utilisées ont été obtenues du stock central de drosophile de Bloomington, sauf celles notées. La lignée $w ; GFP::BubR1$ nous a été généreusement donnée par Roger Karess. Le stock $RPA70::EGFP$ est un cadeau de Shelby A. Blythe. La lignée $GFP::ORC2 ; ORC2^{n4}/ORC2^l$ a été récupérée du stock central de Kyoto. La souche délétée pour les deux gènes *Mst35B* ($\Delta Mst35B$) a été générée comme décrit dans Tirmarche *et al*, 2014.

Cytologie

Les marquages sur embryons ont été réalisés comme décrit précédemment (voir l'article ci-dessus (Delabaere *et al*, 2014)).

Pour les observations de fluorescence native sur testicules entiers, les testicules ont été disséqués puis fixés dans du PBS-Triton 0,15%, formaldéhyde 4% pendant 25 minutes à température ambiante. Ils ont ensuite été traités à la RNase A 2mg/ml pendant 30 minutes à 37°C et montés dans du milieu de montage (Dako) contenant 5µg/ml de iodure de propidium (Sigma).

Pour les testicules étalées (*testes squash*), les lames ont été préparées comme décrit dans l'article en annexe (Dubruille *et al*, 2010).

Les anticorps utilisés sont : anti-GFP, polyclonal de lapin (A11122, Invitrogen; 1:500) ou monoclonal de souris (118144600001, Roche; 1:250), anti-H3K27me2 polyclonal de lapin (07- 452, Millipore; 1:1000), anti-histones monoclonal de souris (MABE71, Millipore; 1:1500), anti-H4 acétylée polyclonal de lapin (06-598, Upstate; 1:200), anti-PCNA monoclonale de souris (PC10, Abcam; 1:1000), anti-topoisomérase IIα polyclonal de lapin (45175, Abcam; 1:250).

Les images de microscopie confocale ont été prises avec un microscope LSM510 (Carl Zeiss) et traitées par les logiciels ImageJ et Photoshop (Adobe).

Tests de fertilité

Les tests de fertilité ont été faits comme décrit précédemment (Delabaere *et al*, 2014).

RT-PCR

La purification des ARNs totaux ainsi que la RT-PCR ont été faites comme décrit précédemment dans l'article ci-dessus (Delabaere *et al*, 2014). Les amorces utilisées en PCR sont : 5'-AAGATCGTGAAGAAGCGCAC-3' et 5'-ACTCGTTCTCTTGAGAACGC-3' pour *Rp49*, ainsi que 5'-TGAGTGCCAGCAACAAAGGC-3' et 5'-CTACTGGGCGTTTTGGGCTC-3' pour *ORC2*.

REFERENCES

Ahmad K & Henikoff S (2002) The Histone Variant H3.3 Marks Active Chromatin by Replication-Independent Nucleosome Assembly. *Molecular Cell* **9**: 1191-1200.

Akama K, Kondo M, Sato H & Nakano M (1999a) Transition protein 4 from boar late spermatid nuclei is a topological factor that stimulates DNA-relaxing activity of topoisomerase I. *FEBS Lett.* **442**: 189-92

Akama K, Sato H, Hasegawa S & Shimada I (1998b) Transition protein 1 from boar late spermatid nuclei having DNA-melting activity is a dimeric protein. *Biochem Mol Biol Int.* **44**: 315-23

Alani E, Thresher R, Griffith J & Kolodner R (1992) Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of y-RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *Journal of Molecular Biology* **227**: 54-71

Arimondo P, Riou J-F, Mergny J-L, Tazi J, Sun J-S, Garestier T & Hélène C (2000) Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures. *Nucleic Acids Research* **28**: 4832–4838

Asano M & Wharton RP (1999) E2F mediates developmental and cell cycle regulation of ORC1 in *Drosophila*. *The EMBO journal* **18**: 2435–48

Ausió J (1999) Histone H1 and Evolution of Sperm Nuclear Basic Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 31115–31118

Austin RJ, Orr-Weaver TL & Bell SP (1999) *Drosophila* ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element. *Genes & development* **13**: 2639-49

Baldinger T & Gossen M (2009) Binding of *Drosophila* Orc Proteins to Anaphase Chromosomes Requires Cessation of Mitotic Cyclin-Dependent Kinase Activity. *Molecular and Cellular Biology* **29**: 140–9

Beach D, Piper M & Shall S (1980) Isolation of chromosomal origins of replication in yeast. *Nature* **284**: 185–7

Beck DB, Oda H, Shen SS & Reinberg D (2012) PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes & development* **26**: 325–37

Bell S & Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry* **71**: 333–74

Bell SP & Stillman B (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* **357**: 128–34

Belyaeva ES, Goncharov FP, Demakova OV, Kolesnikova TD, Boldyreva LV, Semeshin VF & Zhimulev IF (2012) Late replication domains in polytene and non-polytene cells of *Drosophila melanogaster*. *PloS one* **7**: e30035

Bennetts LE, De Iuliis GN, Nixon B, Kime M, Zelski K, McVicar CM, Lewis SE & Aitken

- RJ (2008) Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutation research* **641**: 1–11
- Bernard P, Drogat J, Maure J-FF, Dheur S, Vaur S, Genier S & Javerzat J-PP (2006) A screen for cohesion mutants uncovers Ssl3, the fission yeast counterpart of the cohesin loading factor Scc4. *Current biology* **16**: 875–81
- Bétous R, Rey L, Wang G, Pillaire M, Puget N, Selves J, Biard D, Shin-ya K, Vasquez K, Cazaux C & Hoffmann J (2009) Role of TLS DNA polymerases eta and kappa in processing naturally occurring structured DNA in human cells. *Molecular Carcinogenesis* **48**: 369–78
- Binz S, Sheehan A & Wold M (2004) Replication Protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair* **3**: 10151024
- Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG & Sakkas D (2000) Sperm decondensation during fertilisation in the mouse: presence of DNase I hypersensitive sites in situ and a putative role for topoisomerase II. *Zygote (Cambridge, England)* **8**: 197–202
- Blastyák A, Pintér L, Unk I, Prakash L, Prakash S & Haracska L (2007) Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Molecular cell* **28**: 167–75
- Bomar J, Moreira P, Balise JJ & Collas P (2002) Differential regulation of maternal and paternal chromosome condensation in mitotic zygotes. *Journal of cell science* **115**: 2931–40
- Bonnefoy E, Orsi G, Couble P & Loppin B (2007) The Essential Role of Drosophila HIRA for De Novo Assembly of Paternal Chromatin at Fertilization. *PLoS Genetics* **3**: 1991–2006
- Bonnet-Garnier A, Feuerstein P, Chebrout M, Fleurot R, Jan H-UU, Debey P & Beaujean N (2012) Genome organization and epigenetic marks in mouse germinal vesicle oocytes. *The International journal of developmental biology* **56**: 877–87
- Braun R (2001) Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature genetics* **28**: 10–2
- Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, Wang P, DeMayo FJ, Frail DE, Eppig JJ & Matzuk MM (2003) Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science (New York, N.Y.)* **300**: 633–6
- Burton A & Torres-Padilla M-EE (2010) Epigenetic reprogramming and development: a unique heterochromatin organization in the preimplantation mouse embryo. *Briefings in functional genomics* **9**: 444–54
- Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak M, Pilch D, Staudt D, Lee A, Bonner R, Bonner W & Nussenzweig A (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature Cell Biology* **5**: 675–9
- Centore R, Yazinski S, Tse A & Zou L (2012) Spartan/C1orf124, a Reader of PCNA Ubiquitylation and a Regulator of UV-Induced DNA Damage Response. *Molecular Cell* **46**: 625–35

Charlat S & Merçot H (2001) Cytoplasmic incompatibility and maternal-haploid. *Trends in genetics : TIG* **17**: 440–1

Chen P, Zhao J, Wang Y, Wang M, Long H, Liang D, Huang L, Wen Z, Li W, Li X, Feng H, Zhao H, Zhu P, Li M, Wang QF & Li G (2013) H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin. *Genes & development* **27**: 2109–24
Chesnokov I (2007) Multiple functions of the origin recognition complex. *International review of cytology* **256**: 69–109

Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB & Eddy EM (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nature genetics* **28**: 82–6

Chu DS, Liu H, Nix P, Wu TF, Ralston EJ, Yates JR & Meyer BJ (2006) Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors. *Nature* **443**: 101–5

Chung I, Mehta V, Spitzner J & Muller M (1992) Eukaryotic topoisomerase II cleavage of parallel stranded DNA tetraplexes. *Nucleic Acids Research* **20**: 1973–1977

Ciapponi L, Cenci G, Ducau J, Flores C, Johnson-Schlitz D, Gorski MM, Engels WR & Gatti M (2004) The Drosophila Mre11/Rad50 complex is required to prevent both telomeric fusion and chromosome breakage. *Current biology* **14**: 1360–6

Ciosk R, Shirayama M, Shevchenko A, Tanaka T, Toth A, Shevchenko A & Nasmyth K (2000) Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Molecular cell* **5**: 243–54

Crevel G & Cotterill S (1995) DF 31, a sperm decondensation factor from Drosophila melanogaster: purification and characterization. *The EMBO journal* **14**: 1711–7

Cuylen S & Haering C (2011) Deciphering condensin action during chromosome segregation. *Trends in cell biology* **21**: 552–9

CVETIC C & WALTER J (2005) Eukaryotic origins of DNA replication: could you please be more specific? *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**: 343–53

Davis E, Lachaud C, Appleton P, Macartney T, Näthke I & Rouse J (2012) DVC1 (C1orf124) recruits the p97 protein segregase to sites of DNA damage. *Nature structural & molecular biology* **19**: 1093–100

De La Fuente R (2006) Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Developmental biology* **292**: 1–12

Deans A & West S (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature Reviews Cancer* **11**: 467–80

DEBEC A (1978) Haploid cell cultures of Drosophila melanogaster. *Nature* **274**: 255–256
Debec A (1984) Evolution of karyotype in haploid cell lines of Drosophila melanogaster. *Experimental cell research* **151**: 236–46

- Dej K, Ahn C & Orr-Weaver T (2004) Mutations in the *Drosophila* Condensin Subunit dCAP-G Defining the Role of Condensin for Chromosome Condensation in Mitosis and Gene Expression in Interphase. *Genetics* **168**: 895–906
- Derijck A, Heijden G, Giele M, Philippens M, Bavel C & Boer P (2006a) γ H2AX signalling during sperm chromatin remodelling in the mouse zygote. *DNA Repair* **5**: 959–71
- Derijck A, van der Heijden G, Giele M, Philippens M & de Boer P (2008b) DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Human molecular genetics* **17**: 1922–37
- Diffley JF, Cocker JH, Dowell SJ & Rowley A (1994) Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell* **78**: 303–16
- Dimitrov S, Dasso MC & Wolffe AP (1994) Remodeling sperm chromatin in *Xenopus laevis* egg extracts: the role of core histone phosphorylation and linker histone B4 in chromatin assembly. *The Journal of cell biology* **126**: 591–601
- Downs JA, Lowndes NF & Jackson SP (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**:1001-4
- Dubruille R, Orsi GA, Delabaere L, Cortier E, Couble P, Marais GA & Loppin B (2010) Specialization of a *Drosophila* capping protein essential for the protection of sperm telomeres. *Current biology* **20**: 2090–9
- Duncker B, Chesnokov I & McConkey B (2009) The origin recognition complex protein family. *Genome Biology* **10**: 214
- Eaton ML, Prinz JA, MacAlpine HK, Tretyakov G, Kharchenko PV & MacAlpine DM (2011) Chromatin signatures of the *Drosophila* replication program. *Genome research* **21**: 164–74
- Edgar BA, Kiehle CP & Schubiger G (1986) Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early *Drosophila* development. *Cell* **44**: 365–72
- Edwards DN, Machwe A, Wang Z & Orren DK (2014) Intramolecular telomeric G-quadruplexes dramatically inhibit DNA synthesis by replicative and translesion polymerases, revealing their potential to lead to genetic change. *PLoS one* **9**: e80664
- Ford J & Schumacher J (2009) Chromosome Dynamics: The Case of the Missing Condensin. *Current Biology* **19**: R127-9
- Frehlick LJ, Eirín-López JM, Prado A, Su HW, Kasinsky HE & Ausió J (2006) Sperm nuclear basic proteins of two closely related species of Scorpaeniform fish (*Sebastes maliger*, *Sebastolobus* sp.) with different sexual reproduction and the evolution of fish protamines. *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative experimental biology* **305**: 277–87
- Froelich-Ammon S, Gale K & Osheroff N (1994) Site-specific cleavage of a DNA hairpin by

topoisomerase II. DNA secondary structure as a determinant of enzyme recognition/cleavage. *The Journal of biological chemistry* **269**: 7719–25

Fu H, Maunakea A, Martin M, Huang L, Zhang Y, Ryan M, Kim R, Lin C, Zhao K & Aladjem M (2013) Methylation of histone H3 on lysine 79 associates with a group of replication origins and helps limit DNA replication once per cell cycle. *PLoS genetics* **9**: e1003542

Gans M, Audit C & Masson M (1975) Isolation and characterization of sex-linked female-sterile mutants in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **81**: 683–704

Gao G, Cheng Y, Wesolowska N & Rong YS (2011) Paternal imprint essential for the inheritance of telomere identity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 4932–7

Gao G, Walser J-CC, Beaucher ML, Morciano P, Wesolowska N, Chen J & Rong YS (2010) HipHop interacts with HOAP and HP1 to protect *Drosophila* telomeres in a sequence-independent manner. *The EMBO journal* **29**: 819–29

Gassmann R, Rechtsteiner A, Yuen K, Muroyama A, Egelhofer T, Gaydos L, Barron F, Maddox P, Essex A, Monen J, Ercan S, Lieb J, Oegema K, Strome S & Desai A (2012) An inverse relationship to germline transcription defines centromeric chromatin in *C. elegans*. *Nature* **484**: 534–7

Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, Curtet S, Buchou T, Bertrand S, Hery P, Jounier S, Depaux A, Vitte A-LL, Guardioli P, Pernet K, Debernardi A, Lopez F, Holota H, Imbert J, Wolgemuth DJ, Gérard M, Rousseaux S & Khochbin S (2012) Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *The EMBO journal* **31**: 3809–20

Ghosal G & Chen J (2013) DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome. *Translational cancer research* **2**: 107–129

Ghosal G, Leung J, Nair B, Fong K-W & Chen J (2012) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding protein C1orf124 is a regulator of translesion synthesis. *The Journal of biological chemistry* **287**: 34225–33

Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM & Zalensky AO (2000) Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *The Journal of cell biology* **151**: 1591–8

Graumann P & Knust T (2009) Dynamics of the bacterial SMC complex and SMC-like proteins involved in DNA repair. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **17**: 265–75

Grosshans J, Müller HA & Wieschaus E (2003) Control of cleavage cycles in *Drosophila* embryos by frühstart. *Developmental cell* **5**: 285–94

Guo H, Zhu P, Yan L, Li R, Hu B, Lian Y, Yan J, Ren X, Lin S, Li J, Jin X, Shi X, Liu P, Wang X, Wang W, Wei Y, Li X, Guo F, Wu X, Fan X, et al (2014) The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* **511**: 606–610

- Haarhuis JH, Elbatsh AM, van den Broek B, Camps D, Erkan H, Jalink K, Medema RH & Rowland BD (2013) WAPL-mediated removal of cohesin protects against segregation errors and aneuploidy. *Current biology* **23**: 2071–7
- Hall JR, Lee HO, Bunker BD, Dorn ES, Rogers GC, Duronio RJ & Cook JG (2008) Cdt1 and Cdc6 are destabilized by rereplication-induced DNA damage. *The Journal of biological chemistry* **283**: 25356–63
- Hamer G (2002) DNA Double-Strand Breaks and gamma-H2AX Signaling in the Testis. *Biology of Reproduction* **68**: 628-34
- Handyside AH (2012) Molecular origin of female meiotic aneuploidies. *Biochimica et biophysica acta* **1822**: 1913–20
- Har-Vardi I, Mali R, Breietman M, Sonin Y, Albotiano S, Levitas E, Potashnik G & Priel E (2007) DNA topoisomerases I and II in human mature sperm cells: characterization and unique properties. *Human Reproduction* **22**: 2183–2189
- Hartl T, Boswell C, Orr-Weaver T & Bosco G (2007) Developmentally regulated histone modifications in Drosophila follicle cells: initiation of gene amplification is associated with histone H3 and H4 hyperacetylation and H1 phosphorylation. *Chromosoma* **116**: 197214
- Hauf S, Waizenegger I & Peters J-M (2001) Cohesin Cleavage by Separase Required for Anaphase and Cytokinesis in Human Cells. *Science* **293**: 1320–1323
- Helmrich A, Ballarino M, Nudler E & Tora L (2013) Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**: 412–418
- Hirano T (2006) At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**: 311–22
- Hirano T, Kobayashi R & Hirano M (1997) Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein. *Cell* **89**: 511–21
- Hirano T & Mitchison TJ (1994) A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* **79**: 449–58
- Ho T & Schärer O (2010) Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair. *Environmental and molecular mutagenesis* **51**: 552–66
- Hudson DF, Marshall KM & Earnshaw WC (2009) Condensin: Architect of mitotic chromosomes. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **17**: 131–44
- Hyrien O (2000) Mechanisms and consequences of replication fork arrest. *Biochimie* **82**: 5-17
- Hyrien O & Méchali M (1993) Chromosomal replication initiates and terminates at random

sequences but at regular intervals in the ribosomal DNA of *Xenopus* early embryos. *The EMBO journal* **12**: 4511–20

Iacovoni JS, Caron P, Lassadi I, Nicolas E, Massip L, Trouche D & Legube G (2010) High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *The EMBO journal* **29**: 1446–57

Inoue A, Ogushi S, Saitou M, Suzuki MG & Aoki F (2011) Involvement of mouse nucleoplasmin 2 in the decondensation of sperm chromatin after fertilization. *Biology of reproduction* **85**: 70–7

Inoue A & Zhang Y (2014) Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly in mouse zygotes. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**: 609616

Itoh T, Ausio J & Katagiri C (1997) Histone H1 variants as sperm-specific nuclear proteins of *Rana catesbeiana*, and their role in maintaining a unique condensed state of sperm chromatin. *Molecular reproduction and development* **47**: 181–90

Jarosz DF, Godoy VG, Delaney JC, Essigmann JM & Walker GC (2006) A single amino acid governs enhanced activity of DinB DNA polymerases on damaged templates. *Nature* **439**: 225–8

Jayaramaiah Raja S & Renkawitz-Pohl R (2005) Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Molecular and cellular biology* **25**: 6165–77

Johnson R, Haracska L, Prakash S & Prakash L (2001) Role of DNA Polymerase in the Bypass of a (6-4) TT Photoproduct. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 35583563
Juhasz S, Balogh D, Hajdu I, Burkovics P, Villamil M, Zhuang Z & Haracska L (2012) Characterization of human Spartan/C1orf124, an ubiquitin-PCNA interacting regulator of DNA damage tolerance. *Nucleic acids research* **40**: 10795–808

Julianelli V, Farrando B, Sedó C, Calvo L, Romanato M & Calvo J (2012) Heparin enhances protamine disulfide bond reduction during in vitro decondensation of human spermatozoa. *Human reproduction (Oxford, England)* **27**: 1930–8

Jørgensen S, Elvers I, Trelle M, Menzel T, Eskildsen M, Jensen O, Helleday T, Helin K & Sørensen C (2007) The histone methyltransferase SET8 is required for S-phase progression. *The Journal of cell biology* **179**: 1337–1345

Kadir R, Bakhrat A, Tokarsky R & Abdu U (2012) Localization of the *Drosophila* Rad9 protein to the nuclear membrane is regulated by the C-terminal region and is affected in the meiotic checkpoint. *PloS one* **7**: e38010

Kai M (2013) Role of the checkpoint clamp in DNA damage response. *Biomolecules* **3**: 75–84

Karras GI, Fumasoni M, Sienski G, Vanoli F, Branzei D & Jentsch S (2013) Noncanonical

role of the 9-1-1 clamp in the error-free DNA damage tolerance pathway. *Molecular cell* **49**: 536–46

Kasinsky HE, Eirín-López JM & Ausió J (2011) Protamines: structural complexity, evolution and chromatin patterning. *Protein and peptide letters* **18**: 755–71

Kawasaki K, Philpott A, Avilion AA & Berrios M (1994) Chromatin decondensation in *Drosophila* embryo extracts. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 10169–76

Kenney RD & Heald R (2006) Essential roles for cohesin in kinetochore and spindle function in *Xenopus* egg extracts. *Journal of cell science* **119**: 5057–66

Kim MS, Machida Y, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Pang Y-PP & Machida YJ (2013) Regulation of error-prone translesion synthesis by Spartan/C1orf124. *Nucleic acids research* **41**: 1661–8

Kim Y & Kipreos ET (2007) Cdt1 degradation to prevent DNA re-replication: conserved and non-conserved pathways. *Cell division* **2**: 18

Kimura K & Hirano T (1997a) ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell* **90**: 625–34

Kimura K & Hirano T (2000b) Dual roles of the 11S regulatory subcomplex in condensin functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 11972–7

Konev A, Tribus M, Park S, Podhraski V, Lim C, Emelyanov A, Vershilova E, Pirrotta V, Kadonaga J, Lusser A & Fyodorov D (2007) CHD1 Motor Protein Is Required for Deposition of Histone Variant H3.3 into Chromatin in Vivo. *Science* **317**: 1087–1090

Kong D & DePamphilis ML (2001) Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. *Molecular and cellular biology* **21**: 8095–103

Kourmouli N, Jeppesen P, Mahadevhaiah S, Burgoyne P, Wu R, Gilbert DM, Bongiorno S, Prantera G, Fanti L, Pimpinelli S, Shi W, Fundele R & Singh PB (2004) Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *Journal of cell science* **117**: 2491–501

Krokan H, Wist E & Krokan R (1981) Aphidicolin inhibits DNA synthesis by DNA polymerase alpha and isolated nuclei by a similar mechanism. *Nucleic acids research* **9**: 4709–19

Kurtz K, Saperas N, Ausió J & Chiva M (2009) Spermiogenic nuclear protein transitions and chromatin condensation. Proposal for an ancestral model of nuclear spermiogenesis. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution* **312B**: 149–63

Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K & Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116–20

Lambert S & Carr A (2005) Checkpoint responses to replication fork barriers. *Biochimie* **87**: 591–602

Lancaster OM, Breuer M, Cullen CF, Ito T & Ohkura H (2010) The meiotic recombination checkpoint suppresses NHK-1 kinase to prevent reorganisation of the oocyte nucleus in *Drosophila*. *PLoS genetics* **6**: e1001179

Landis G, Kelley R, Spradling A & Tower J (1997) The k43 gene, required for chorion gene amplification and diploid cell chromosome replication, encodes the *Drosophila* homolog of yeast origin recognition complex subunit 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 3888–92

Landmann F, Orsi GA, Loppin B & Sullivan W (2009) Wolbachia-mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the male pronucleus. *PLoS pathogens* **5**: e1000343

Lee K & Myung K (2008) PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways. *Molecules and cells* **26**: 5-11

Lehmann A, Niimi A, Ogi T, Brown S, Sabbioneda S, Wing J, Kannouche P & Green C (2007) Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair* **6**: 891–9

Leman A & Noguchi E (2013) The replication fork: understanding the eukaryotic replication machinery and the challenges to genome duplication. *Genes* **4**: 1–32

Lewis J, Song Y, Jong M, Bagha S & Ausió J (2003a) A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* **111**: 473482

Lewis JD, Saperas N, Song Y, Zamora MJ, Chiva M & Ausió J (2004b) Histone H1 and the origin of protamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 4148–52

Li Z, Xiao W & McCormick JJ (2002) Identification of a protein essential for a major pathway used by human cells to avoid UV-induced DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**: 4459-64

Lin C-JJ, Koh FM, Wong P, Conti M & Ramalho-Santos M (2014) Hira-mediated h3.3 incorporation is required for DNA replication and ribosomal RNA transcription in the mouse zygote. *Developmental cell* **30**: 268–79

Ling H, Boudsocq F, Woodgate R & Yang W (2001) Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell* **107**: 91–102

Loppin B, Docquier M, Bonneton F & Couble P (2000) The maternal effect mutation *sésame* affects the formation of the male pronucleus in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* **222**: 392–404

- Loppin B, Berger F & Couble P (2001) Paternal chromosome incorporation into the zygote nucleus is controlled by maternal haploid in *Drosophila*. *Developmental biology* **231**: 383–96
- Loppin B, Bonnefoy E, Anselme C, Laurençon A, Karr T & Couble P (2005a) The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature* **437**: 1386–90
- Loppin B, Lepetit D, Dorus S, Couble P & Karr T (2005b) Origin and Neofunctionalization of a *Drosophila* Paternal Effect Gene Essential for Zygote Viability. *Current Biology* **15**: 87–93
- Losada A (2014) Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond. *Nature reviews. Cancer* **14**: 389–93
- Loupart M-L, Krause S & Heck M (2000) Aberrant replication timing induces defective chromosome condensation in *Drosophila* ORC2 mutants. *Current Biology* **10**: 1547–56
- Lu X, Li JM, Elemento O, Tavazoie S & Wieschaus EF (2009) Coupling of zygotic transcription to mitotic control at the *Drosophila* mid-blastula transition. *Development (Cambridge, England)* **136**: 2101–10
- Lukusa T & Fryns JP (2008) Human chromosome fragility. *Biochimica et biophysica acta* **1779**: 3–16
- Lusser A, Urwin DL & Kadonaga JT (2005) Distinct activities of CHD1 and ACF in ATP-dependent chromatin assembly. *Nature structural & molecular biology* **12**: 160–6
- Machida Y, Kim M & Machida Y (2012) Spartan/C1orf124 is important to prevent UV-induced mutagenesis. *Cell Cycle* **11**: 3395–402
- Machida YJ, Hamlin JL & Dutta A (2005) Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* **123**: 13–24
- Madigan JP, Chotkowski HL & Glaser RL (2002) DNA double-strand break-induced phosphorylation of *Drosophila* histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis. *Nucleic acids research* **30**: 3698–705
- Maiorano D, Lutzmann M & Méchali M (2006) MCM proteins and DNA replication. *Current opinion in cell biology* **18**: 130–6
- Malo A, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler A & Roldan E (2006) Sperm design and sperm function. *Biology Letters* **2**: 246249
- Matsumoto K & Nagata K (1999) Sperm chromatin decondensation by template activating factor I through direct interaction with basic proteins. *Molecular and cellular biology* **19**: 6940–52
- Maundrell K, Hutchison A & Shall S (1988) Sequence analysis of ARS elements in fission yeast. *The EMBO journal* **7**: 2203–9

Méchali M (2010) Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**: 728–38

Meistrich ML, Weige PK, Lin R, Allis DC & Bhatnagar YM (1992) Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Molecular reproduction and development* **31**: 170–181

Meraldi P, Draviam VM & Sorger PK (2004) Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Developmental cell* **7**: 45–60

Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Ihara M, Meistrich ML, Austin CA & Meyer RG (2011) Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biology of reproduction* **84**: 900–9

Miotto B & Struhl K (2010) HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin. *Molecular cell* **37**: 57–66

Miyabe I, Kunkel T & Carr A (2011) The major roles of DNA polymerases epsilon and delta at the eukaryotic replication fork are evolutionarily conserved. *PLoS genetics* **7**: e1002407

Miyase S, Tateishi S, Watanabe K, Tomita K, Suzuki K, Inoue H & Yamaizumi M (2005) Differential regulation of Rad18 through Rad6-dependent mono- and polyubiquitination. *The Journal of biological chemistry* **280**: 515–24

Moldovan G-LL, Pfander B & Jentsch S (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**: 665–79

Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, Shiota H, Debernardi A, Héry P, Curtet S, Jamshidikia M, Barral S, Holota H, Bergon A, Lopez F, Guardiola P, Pernet K, Imbert J, Petosa C, Tan M, et al (2013) Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes & development* **27**: 1680–92

Morin V, Sanchez-Rubio A, Aze A, Iribarren C, Fayet C, Desdevises Y, Garcia-Huidobro J, Imschenetzky M, Puchi M & Genevière A-MM (2012) The protease degrading sperm histones post-fertilization in sea urchin eggs is a nuclear cathepsin L that is further required for embryo development. *PloS one* **7**: e46850

Mosbech A, Gibbs-Seymour I, Kagias K, Thorslund T, Beli P, Povlsen L, Nielsen S, Smedegaard S, Sedgwick G, Lukas C, Hartmann-Petersen R, Lukas J, Choudhary C, Pocock R, Bekker-Jensen S & Mailand N (2012) DVC1 (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks. *Nature structural & molecular biology* **19**: 1084–92

Murphy CT, Gupta A, Armitage BA & Opresko PL (2014) Hybridization of G-Quadruplex-Forming Peptide Nucleic Acids to Guanine-Rich DNA Templates Inhibits DNA Polymerase η Extension. *Biochemistry* **53**: 5315–22

- Musacchio A & Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**: 379–93
- Neeley WL, Delaney S, Alekseyev YO, Jarosz DF, Delaney JC, Walker GC & Essigmann JM (2007) DNA polymerase V allows bypass of toxic guanine oxidation products in vivo. *The Journal of biological chemistry* **282**: 12741–8
- Nelson JR, Lawrence CW & Hinkle DC (1996a) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science (New York, N.Y.)* **272**: 1646–9
- Nelson JR, Lawrence CW & Hinkle DC (1996b) Deoxycytidyl transferase activity of yeast REV1 protein. *Nature* **382**: 729–31
- Newlon C & Theis J (1993) The structure and function of yeast ARS elements. *Current opinion in genetics & development* **3**: 752–8
- Ni J-QQ, Zhou R, Czech B, Liu L-PP, Holderbaum L, Yang-Zhou D, Shim H-SS, Tao R, Handler D, Karpowicz P, Binari R, Booker M, Brennecke J, Perkins LA, Hannon GJ & Perrimon N (2011) A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nature methods* **8**: 405–7
- Nicklas RB, Waters JC, Salmon ED & Ward SC (2001) Checkpoint signals in grasshopper meiosis are sensitive to microtubule attachment, but tension is still essential. *Journal of cell science* **114**: 4173–83
- Nishitani H & Lygerou Z (2002) Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **7**: 523–34
- Noblanc A, Damon-Soubeyrand C, Karrich B, Henry-Berger J, Cadet R, Saez F, Guiton R, Janny L, Pons-Rejraji H, Alvarez JG, Drevet JR & Kocer A (2013) DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free radical biology & medicine* **65**: 719–23
- Okuno Y, Satoh H, Sekiguchi M & Masukata H (1999) Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin. *Molecular and cellular biology* **19**: 6699–709
- Oliva R (2006) Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update* **12**: 417–435
- Ooi SL, Priess JR & Henikoff S (2006) Histone H3.3 variant dynamics in the germline of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics* **2**: e97
- Orsi GA, Algazeery A, Meyer RE, Capri M, Sapey-Triomphe LM, Horard B, Gruffat H, Couble P, Aït-Ahmed O & Loppin B (2013) *Drosophila* Yemanuclein and HIRA cooperate for de novo assembly of H3.3-containing nucleosomes in the male pronucleus. *PLoS genetics* **9**: e1003285

- Orsi GA, Couble P & Loppin B (2009) Epigenetic and replacement roles of histone variant H3.3 in reproduction and development. *The International journal of developmental biology* **53**: 231–43
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W & Walter J (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current biology* **10**: 475–8
- Padeganeh A, De Rop V & Maddox PS (2013) Nucleosomal composition at the centromere: a numbers game. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **21**: 27–36
- Park SY & Asano M (2008) The origin recognition complex is dispensable for endoreplication in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 12343–8
- Paull T, Rogakou E, Yamazaki V, Kirchgessner C, Gellert M & Bonner W (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* **10**: 886–95
- Paunesku T, Mittal S, Protić M, Oryhon J, Korolev S, Joachimiak A & Woloschak G (2001) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *International Journal of Radiation Biology* **77**: 10071021
- Peretz G, Arie LG, Bakhrat A & Abdu U (2009) The *Drosophila* hus1 gene is required for homologous recombination repair during meiosis. *Mechanisms of development* **126**: 677–86
- Petrushenko ZM, Lai C-HH, Rai R & Rybenkov VV (2006) DNA reshaping by MukB. Right-handed knotting, left-handed supercoiling. *The Journal of biological chemistry* **281**: 4606–15
- Pflumm MF & Botchan MR (2001) Orc mutants arrest in metaphase with abnormally condensed chromosomes. *Development (Cambridge, England)* **128**: 1697–707
- Philpott A & Leno GH (1992) Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell* **69**: 759–67
- Philpott A, Leno GH & Laskey RA (1991) Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell* **65**: 569–78
- Plohl M, Meštrović N & Mravinac B (2014) Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma* **123**: 313–25
- Prasanth SG, Prasanth KV, Siddiqui K, Spector DL & Stillman B (2004) Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *The EMBO journal* **23**: 2651–63
- Putter V & Grummt F (2002) Transcription termination factor TTF-I exhibits contrahelicase activity during DNA replication. *EMBO reports* **3**: 147–52
- Quinn L, Herr A, McGarry T & Richardson H (2001) The *Drosophila* Geminin homolog:

roles for Geminin in limiting DNA replication, in anaphase and in neurogenesis. *Genes & Development* **15**: 2741-2754

Raff J (2003) Cell division: Genome maintenance. *Nature* **423**: 493–495

Räschle M, Knipscheer P, Knipscheer P, Enoiu M, Angelov T, Sun J, Griffith J, Ellenberger T, Schärer O & Walter J (2008) Mechanism of Replication-Coupled DNA Interstrand Crosslink Repair. *Cell* **134**: 969–80

Rathke C, Baarends W, Jayaramaiah-Raja S, Bartkuhn M, Renkawitz R & Renkawitz-Pohl R (2007) Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *Journal of Cell Science* **120**: 1689–700

Rathke C, Baarends WM, Awe S & Renkawitz-Pohl R (2014) Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1839**: 155–68

Rathke C, Barckmann B, Burkhard S, Jayaramaiah-Raja S, Roote J & Renkawitz-Pohl R (2010) Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *European journal of cell biology* **89**: 326–38

Raychaudhuri N, Dubruielle R, Orsi GA, Bagheri HC, Loppin B & Lehner CF (2012) Transgenerational propagation and quantitative maintenance of paternal centromeres depends on Cid/Cenp-A presence in *Drosophila* sperm. *PLoS biology* **10**: e1001434

Remeseiro S & Losada A (2013) Cohesin, a chromatin engagement ring. *Current opinion in cell biology* **25**: 63–71

Rice P, Garduño R, Itoh T, Katagiri C & Ausio J (1995) Nucleoplasmin-mediated decondensation of *Mytilus* sperm chromatin. Identification and partial characterization of a nucleoplasmin-like protein with sperm-nuclei decondensing activity in *Mytilus californianus*. *Biochemistry* **34**: 7563–8

Romanato M, Julianelli V, Zappi M, Calvo L & Calvo JC (2008) The presence of heparan sulfate in the mammalian oocyte provides a clue to human sperm nuclear decondensation in vivo. *Human reproduction* **23**: 1145–1150

Rong YS (2008) Telomere capping in *Drosophila*: dealing with chromosome ends that most resemble DNA breaks. *Chromosoma* **117**: 235–42

Roy S, Ernst J, Kharchenko PV, Kheradpour P, Negre N, Eaton ML, Landolin JM, Bristow CA, Ma L, Lin MF, Washietl S, Arshinoff BI, Ay F, Meyer PE, Robine N, Washington NL, Di Stefano L, Berezhikov E, Brown CD, Candeias R, et al (2010) Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science (New York, N.Y.)* **330**: 1787–97

Royou A, Gagou ME, Karess R & Sullivan W (2010) BubR1- and Polo-coated DNA tethers facilitate poleward segregation of acentric chromatids. *Cell* **140**: 235–45

Royzman I, Austin RJ, Bosco G, Bell SP & Orr-Weaver TL (1999) ORC localization in

Drosophila follicle cells and the effects of mutations in dE2F and dDP. *Genes & development* **13**: 827–40

Saitoh N, Goldberg IG, Wood ER & Earnshaw WC (1994) ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *The Journal of Cell Biology* **127**: 303–318

Sakkas D & Alvarez J (2010) Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and sterility* **93**: 1027–36

Santamaria P & Gans M (1980) Chimaeras of *Drosophila melanogaster* obtained by injection of haploid nuclei. *Nature* **287**: 143–144

Saperas N & Ausió J (2013) Sperm nuclear basic proteins of tunicates and the origin of protamines. *The Biological bulletin* **224**: 127–36

Sarkar S, Davies A, Ulrich H & McHugh P (2006) DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase ζ . *The EMBO Journal* **25**: 1285–94

Savvidou E, Cobbe N, Steffensen S, Cotterill S & Heck M (2005) *Drosophila* CAP-D2 is required for condensin complex stability and resolution of sister chromatids. *Journal of cell science* **118**: 2529–43

Schepers A & Papior P (2010) Why are we where we are? Understanding replication origins and initiation sites in eukaryotes using ChIP-approaches. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **18**: 63–77

Schwartz BE & Ahmad K (2005) Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3. 3. *Genes & development* **19**: 804–814

Scott KC & Sullivan BA (2014) Neocentromeres: a place for everything and everything in its place. *Trends in genetics : TIG* **30**: 66–74

Seppenwol S, Ris H & Roberts TM (1989) A unique cytoskeleton associated with crawling in the amoeboid sperm of the nematode, *Ascaris suum*. *The Journal of cell biology* **108**: 55–66

Shakes DC, Wu J-CC, Sadler PL, Laprade K, Moore LL, Noritake A & Chu DS (2009) Spermatogenesis-specific features of the meiotic program in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics* **5**: e1000611

Shaman JA, Yamauchi Y & Ward WS (2007) Function of the sperm nuclear matrix. *Archives of andrology* **53**: 135–40

Shermoen AW, McClelland ML & O'Farrell PH (2010) Developmental control of late replication and S phase length. *Current biology : CB* **20**: 2067–77

Sibon O, Laurençon A, Hawley R & Theurkauf W (1999a) The *Drosophila* ATM homologue

Mei-41 has an essential checkpoint function at the midblastula transition. *Current biology : CB* **9**: 302–12

Sibon O, Stevenson V & Theurkauf W (1997b) DNA-replication checkpoint control at the *Drosophila* midblastula transition. *Nature* **388**: 93–7

Sibon OC, Kelkar A, Lemstra W & Theurkauf WE (2000c) DNA-replication/DNA-damage-dependent centrosome inactivation in *Drosophila* embryos. *Nature cell biology* **2**: 90–5

Simpson JC, Wellenreuther R, Poustka A, Pepperkok R & Wiemann S (2000) Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO reports* **1**: 287–92

Sims RJ, Nishioka K & Reinberg D (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends in genetics : TIG* **19**: 629–39

Smith T, Dun M, Smith N, Curry B, Connaughton H & Aitken R (2013) The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. *Journal of cell science* **126**: 1488–97

Sogo J, Lopes M & Foiani M (2002) Fork Reversal and ssDNA Accumulation at Stalled Replication Forks Owing to Checkpoint Defects. *Science* **297**: 599602

Soria G, Belluscio L, van Cappellen WA, Kanaar R, Essers J & Gottifredi V (2009) DNA damage induced Pol eta recruitment takes place independently of the cell cycle phase. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **8**: 3340–8

Speck C, Chen Z, Li H & Stillman B (2005) ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nature structural & molecular biology* **12**: 965–71

Spradling A & Orr-Weaver T (1987) Regulation of DNA replication during *Drosophila* development. *Annual review of genetics* **21**: 373–403

Staller MV, Yan D, Randklev S, Bragdon MD, Wunderlich ZB, Tao R, Perkins LA, Depace AH & Perrimon N (2013) Depleting gene activities in early *Drosophila* embryos with the ‘maternal-Gal4-shRNA’ system. *Genetics* **193**: 51–61

Steele EK, McClure N, Maxwell RJ & Lewis SE (1999) A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Molecular human reproduction* **5**: 831–5

Stinchcomb DT, Struhl K & Davis RW (1979) Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature* **282**: 39–43

Stingle J, Schwarz MS, Bloemeke N, Wolf PG & Jentsch S (2014) A DNA-Dependent Protease Involved in DNA-Protein Crosslink Repair. *Cell* **158**: 327–38

Stucki M & Jackson SP (2006) gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA repair* **5**: 534–43

Sun H, Yabuki A & Maizels N (2001) A human nuclease specific for G4 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 12444–12449

Sun J & Kong D (2010) DNA replication origins, ORC/DNA interaction, and assembly of pre-replication complex in eukaryotes. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **42**: 433–9

Sun Y, Kucej M, Fan H-YY, Yu H, Sun Q-YY & Zou H (2009) Separase is recruited to mitotic chromosomes to dissolve sister chromatid cohesion in a DNA-dependent manner. *Cell* **137**: 123–32

Takeda DY, Shibata Y, Parvin JD & Dutta A (2005) Recruitment of ORC or CDC6 to DNA is sufficient to create an artificial origin of replication in mammalian cells. *Genes & development* **19**: 2827–36

Talbert PB, Ahmad K, Almouzni G, Ausió J, Berger F, Bhalla PL, Bonner WM, Cande WZ, Chadwick BP, Chan SW, Cross GA, Cui L, Dimitrov SI, Doenecke D, Eirin-López JM, Gorovsky MA, Hake SB, Hamkalo BA, Holec S, Jacobsen SE, et al (2012) A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics & chromatin* **5**: 7

Tardat M, Murr R, Herceg Z & Sardet C (2007) PR-Set7–dependent lysine methylation ensures genome replication and stability through S phase. *The Journal of cell biology* **179**: 1413–26

Tardat M, Brustel J, Kirsh O, Lefevbre C, Callanan M, Sardet C & Julien E (2010) The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nature cell biology* **12**: 1086–93

Taylor SS, Hussein D, Wang Y & Elderkin S (2001) Kinetochore localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components Bub1 and BubR1 are differentially regulated by spindle events in human cells. *Journal of Cell science* **114**: 4385–95

Tirmarche S, Kimura S, Sapey-Triomphe L, Sullivan W, Landmann F & Loppin B (2014) Drosophila Protamine-Like Mst35Ba and Mst35Bb Are Required for Proper Sperm Nuclear Morphology but Are Dispensable for Male Fertility. *G3: Genes|Genomes|Genetics*: g3.114.012724

Togashi T, Bartelt JL, Yoshimura J, Tainaka K & Cox PA (2012) Evolutionary trajectories explain the diversified evolution of isogamy and anisogamy in marine green algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 13692–7

Torres-Padilla M-EE, Bannister AJ, Hurd PJ, Kouzarides T & Zernicka-Goetz M (2006) Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and preimplantation embryos. *The International journal of developmental biology* **50**: 455–61

Tram U, Fredrick K, Werren J & Sullivan W (2006) Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. *Journal of Cell Science* **119**: 3655–63

- Uhlmann F, Wernic D, Poupart MA & Koonin EV (2000) Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* **103**: 375-86
- Ulrich HD & Jentsch S (2000) Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *The EMBO journal* **19**: 3388-97
- Vashee S, Cvetic C, Lu W, Simancek P, Kelly TJ & Walter JC (2003) Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes & development* **17**: 1894-908
- Vogelauer M, Rubbi L, Lucas I, Brewer B & Grunstein M (2002) Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Molecular cell* **10**: 1223-33
- Voineagu I, Narayanan V, Lobachev KS & Mirkin SM (2008) Replication stalling at unstable inverted repeats: interplay between DNA hairpins and fork stabilizing proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 9936-41
- Wang L, Lin C, Lopreiato J & Aladjem M (2006) Cooperative sequence modules determine replication initiation sites at the human beta-globin locus. *Human molecular genetics* **15**: 2613-22
- Wang M-Y, Guo Q-H, Du X-Z, Zhou L, Luo Q, Zeng Q-H, Wang J-L, Zhao H-B & Wang Y-F (2013) HIRA is essential for the development of gibel carp. *Fish Physiology and Biochemistry* **40**: 235244
- Ward W (2011) Regulating DNA supercoiling: sperm points the way. *Biology of reproduction* **84**: 841-3
- Williams BC, Dernburg AF, Puro J, Nokkala S & Goldberg ML (1997) The Drosophila kinesin-like protein KLP3A is required for proper behavior of male and female pronuclei at fertilization. *Development (Cambridge, England)* **124**: 2365-76
- Williams H, Gottesman M & Gautier J (2012) Replication-independent repair of DNA interstrand crosslinks. *Molecular cell* **47**: 140-7
- Wossidlo M, Arand J, Sebastiano V, Lepikhov K, Boiani M, Reinhardt R, Schöler H & Walter J (2010) Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *The EMBO journal* **29**: 1877-88
- Wu L, Liu Y & Kong D (2014) Mechanism of chromosomal DNA replication initiation and replication fork stabilization in eukaryotes. *Science China. Life sciences* **57**: 482-7
- Xu X, Ball L, Chen W, Tian X, Lambrecht A, Hanna M & Xiao W (2013) The yeast Shu complex utilizes homologous recombination machinery for error-free lesion bypass via physical interaction with a Rad51 paralogue. *PloS one* **8**: e81371
- Yan W, Ma L & Burns KH (2003) HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10546-51

Yang W & Woodgate R (2007) What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 15591-8

Yasuda G, Schubiger G & Wakimoto B (1995) Genetic characterization of ms (3) K81, a paternal effect gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **140**: 219-29

Zalenskaya IA, Pospelov VA, Zalensky AO & Vorob'ev VI (1981) Nucleosomal structure of sea urchin and starfish sperm chromatin. Histone H2B is possibly involved in determining the length of linker DNA. *Nucleic acids research* **9**: 473-87

Zalenskaya IA & Zalensky AO (2002) Telomeres in mammalian male germline cells. *International review of cytology* **218**: 37-67

Zalensky A, Tomilin N, Zalenskaya I, Teplitz R & Bradbury E (1997) Telomere-telomere interactions and candidate telomere binding protein(s) in mammalian sperm cells. *Experimental cell research* **232**: 29-41

Zalokar M, Audit C & Erk I (1975) Developmental defects of female-sterile mutants of *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* **47**: 419-32

Zhang H & Freudenreich CH (2007) An AT-rich sequence in human common fragile site FRA16D causes fork stalling and chromosome breakage in *S. cerevisiae*. *Molecular cell* **27**: 367-79

Zhang H & Lawrence CW (2005) The error-free component of the RAD6/RAD18 DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 15954-15959

Zhang H & Tower J (2004) Sequence requirements for function of the *Drosophila* chorion gene locus ACE3 replicator and ori-beta origin elements. *Development (Cambridge, England)* **131**: 2089-99

Zhang X, San Gabriel M & Zini A (2006) Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *Journal of andrology* **27**: 414-20

Zhang Y, Wu X, Guo D, Rechkoblit O & Wang Z (2002) Activities of human DNA polymerase kappa in response to the major benzo[a]pyrene DNA adduct: error-free lesion bypass and extension synthesis from opposite the lesion. *DNA repair* **1**: 559-69

Zhao B, Wang J, Geacintov NE & Wang Z (2006a) Poleta, Polzeta and Rev1 together are required for G to T transversion mutations induced by the (+)- and (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG DNA adducts in yeast cells. *Nucleic acids research* **34**: 417-25

Zhao Z-KK, Li W, Wang M-YY, Zhou L, Wang J-LL & Wang Y-FF (2011b) The role of HIRA and maternal histones in sperm nucleus decondensation in the gibel carp and color crucian carp. *Molecular reproduction and development* **78**: 139-47

Ziegler-Birling C, Helmrich A, Tora L & Torres-Padilla M-E (2009) Distribution of p53 binding protein 1 (53BP1) and phosphorylated H2A.X during mouse preimplantation development in the absence of DNA damage. *The International journal of developmental biology* **53**: 1003–11

Zirkin BR, Chang TS & Heaps J (1980) Involvement of an acrosinlike proteinase in the sulfhydryl-induced degradation of rabbit sperm nuclear protamine. *The Journal of cell biology* **85**: 116–21

Zlotorynski E, Rahat A, Skaug J, Ben-Porat N, Ozeri E, Hershberg R, Levi A, Scherer SW, Margalit H & Kerem B (2003) Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Molecular and cellular biology* **23**: 7143–51

ANNEXES

Specialization of a *Drosophila* Capping Protein Essential for the Protection of Sperm Telomeres

Raphaëlle Dubruille,¹ Guillermo A. Orsi,¹ Lætitia Delabaere,¹ Elisabeth Cortier,¹ Pierre Couble,¹ Gabriel A.B. Marais,² and Benjamin Loppin^{1,*}

¹Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, UMR5534

²Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR5558 Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Lyon, Université Lyon 1, 16 rue Dubois, Bâtiment Gregor Mendel, Villeurbanne, F-69622 Cedex, France

Summary

Background: A critical function of telomeres is to prevent fusion of chromosome ends by the DNA repair machinery. In *Drosophila* somatic cells, assembly of the protecting capping complex at telomeres notably involves the recruitment of HOAP, HP1, and their recently identified partner, HipHop. We previously showed that the *hiphop* gene was duplicated before the radiation of the *melanogaster* subgroup of species, giving birth to *K81*, a unique paternal effect gene specifically expressed in the male germline.

Results: Here we show that *K81* specifically associates with telomeres during spermiogenesis, along with HOAP and HP1, and is retained on paternal chromosomes until zygote formation. In *K81* mutant testes, capping proteins are not maintained at telomeres in differentiating spermatids, resulting in the transmission of uncapped paternal chromosomes that fail to properly divide during the first zygotic mitosis. Despite the apparent similar capping roles of *K81* and HipHop in their respective domain of expression, we demonstrate by in vivo reciprocal complementation analyses that they are not interchangeable. Strikingly, HipHop appeared to be unable to maintain capping proteins at telomeres during the global chromatin remodeling of spermatid nuclei.

Conclusions: Our data demonstrate that *K81* is essential for the maintenance of capping proteins at telomeres in postmeiotic male germ cells. In species of the *melanogaster* subgroup, HipHop and *K81* have not only acquired complementary expression domains, they have also functionally diverged following the gene duplication event. We propose that *K81* specialized in the maintenance of telomere protection in the highly peculiar chromatin environment of differentiating male gametes.

Introduction

Telomeres are specialized nucleoprotein structures at the extremities of eukaryote chromosomes [1–4]. They have at least two essential roles for the maintenance of chromosome integrity. First, they protect chromosome ends from long-term genetic erosion through the addition of repeated sequences. Second, telomere-associated capping protein complexes prevent DNA extremities from being processed as double-strand breaks by the DNA repair machinery. In most eukaryotes, telomerase, a specialized reverse transcriptase, adds

short DNA repeats at the end of chromosomes in a highly regulated manner [1–3]. This activity counteracts the incomplete replication of linear DNA extremities occurring at each cell cycle. Telomere repeats are specifically recognized by DNA binding proteins that participate in the formation of a protective capping complex. For instance, telomeric repeat-binding factors 1 and 2 (TRF1 and TRF2) bind TTAGGG repeats in human telomeres and recruit other capping proteins to form the shelterin complex [2–4]. Thus, the end-replication and capping functions of telomeres are connected in species that have telomerase.

Although telomeres fulfill the same functions in *Drosophila*, their organization is rather unusual. Like other Dipterans, *Drosophila* lacks telomerase activity [5]. Indeed, telomere elongation in *Drosophila* is dependent on the transposition of three related non-long terminal repeat retrotransposons called *HeT-A*, *TART*, and *TAHRE* [6, 7]. *Drosophila* chromosome ends are thus devoid of the short telomere repeats found in other organisms and lack the battery of proteins that specifically binds these sequences. Instead, *Drosophila* telomeres are capped by a set of proteins that associate with chromosome ends independently of the DNA sequence [8–10]. This property is best illustrated by the fact that de novo telomere formation can occur at chromosomes bearing viable terminal deletions in the absence of telomere-specific transposon sequences [11–14]. It has been proposed that this epigenetic protection of *Drosophila* telomeres requires the initial recognition of chromosome extremities by proteins of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) DNA damage response pathways, which then recruit telomere capping proteins [15]. Their presence at telomeres is, in turn, critical to prevent the ligation of chromosome ends by the DNA repair machinery [15].

Well-characterized *Drosophila* capping proteins include heterochromatin protein 1 (HP1, also known as HP1A) and its partner HP1/ORC-associated protein (HOAP) [11, 12, 16, 17]. HP1 is a nonhistone chromosomal protein notably involved in pericentric heterochromatin formation. On polytene chromosomes, HP1 is enriched in the chromocenter but is also detected on many euchromatic bands and at all telomeres [11, 12, 18]. Its essential capping function was revealed by the analysis of *Su(var)205* (encoding HP1) mutant larvae that exhibit chromosome end-to-end fusions in dividing cells such as neuroblasts or imaginal discs [11]. This phenotype is also observed in larvae bearing a mutation in the *caravaggio* (*cav*) gene, which encodes HOAP [17]. HOAP is predominantly enriched at telomeres and is required for the recruitment of other telomere proteins such as Modigliani (Moi) and Verrocchio (Ver) [19, 20], underlining its central role in telomere capping.

Despite their essential role in chromosome protection, several capping proteins, including the recently characterized HOAP-interacting protein, HipHop, have been shown to evolve rapidly [14]. In somatic cells, HipHop is specifically enriched at telomeres, where it directly interacts with HOAP and HP1. Moreover, RNA interference knockdown of *hiphop* in S2 cultured cells results in chromosome fusions at high frequency, thus functionally implicating HipHop in telomere protection [14].

*Correspondence: benjamin.loppin@univ-lyon1.fr

Interestingly, we had previously shown that the duplication of *hiphop* in the *melanogaster* subgroup of species, presumably through a retroposition mechanism, gave rise to *ms(3)K81* (*K81*), a gene specifically expressed in the male germline [21]. The original *K81* male sterile mutant, which was isolated from a natural population in Japan, is associated with a unique paternal effect embryonic lethal phenotype [22]. Indeed, although homozygous *K81* mutant males produce fertilization-competent sperm, their progeny die as aneuploids or gynogenetic haploid embryos after the loss of paternal chromosomes at the first zygotic division [21–24].

In this study, using a combination of genetic and imaging approaches, we demonstrate that *K81* is a male germline-specific capping protein. We show that *K81* is necessary for the association of HOAP and HP1 with telomeres in postmeiotic spermatid nuclei. In the absence of *K81*, mutant gametes transmit uncapped paternal chromosomes to the zygote, with catastrophic consequences at the first mitosis. Finally, despite the apparent similar function of *K81* and *HipHop* in telomere capping, we demonstrate that these sister proteins functionally diverged, suggesting that *K81* specialized in the epigenetic protection of telomeres in differentiating spermatid nuclei.

Results

K81 Localizes at Telomeres in Spermatids

To analyze the distribution of *K81* during spermatogenesis, we generated transgenic flies expressing a GFP::*K81* fusion protein under the *K81* regulatory region (5'*K81-GFP::K81*). This transgene fully rescued the sterility of homozygous *K81* mutant males (Table 1), hence validating this tool to study *K81* function in vivo. For the rest of the experiments, we used 5'*K81-GFP::K81*; *K81*² males that only expressed GFP::*K81*, and not the endogenous protein. We stained adult testes with an anti-GFP antibody to determine the distribution of the recombinant protein. In *Drosophila*, cysts of 16 interconnected primary spermatocytes undergo meiosis to produce groups of 64 haploid spermatids. The differentiation of spermatids, a process known as spermiogenesis, results in the production of mature, individualized male gametes [25]. We observed that GFP::*K81* accumulated in a small number of discrete foci in spermatid nuclei (Figures 1A and 1B). To gain insight into the nature of these foci, we ectopically expressed an mRFP1::*K81* protein in larval salivary glands using the UAS/GAL4 system to determine its distribution on polytene chromosomes. Strikingly, mRFP1::*K81* appeared to be enriched at all chromosome extremities, suggesting that *K81* might also associate with telomeres in spermatid nuclei (Figure 1C). HOAP is a well-characterized telomere marker in *Drosophila* somatic cells [16, 17]. The robust expression of the HOAP encoding gene, *cav*, in adult testes [26] suggested that it could also be involved in the capping of telomeres in male germ cells. Indeed, using a specific antibody, we detected HOAP in discrete foci in spermatid nuclei. Moreover, these foci perfectly colocalized with GFP::*K81* (Figure 1D). Taken together, these results strongly suggested that *K81* was specifically associated with spermatid telomeres.

Typically, spermatid nuclei contained one or two large foci and zero to three smaller foci of GFP::*K81* (Figure 1B), suggesting that the eight expected telomeres of these haploid nuclei gather in a smaller number of clusters over the course of spermatid differentiation.

Table 1. Complementation Analysis of *K81* Paternal Effect Embryonic Lethality

Genotype of Males	Genotype of Females	Number of Eggs	Number of Larvae	Hatching Rate (%)
w/Y; <i>K81</i> ² /TM3	y w	426	297	69.7
w/Y; <i>K81</i> ¹ / <i>K81</i> ²	y w	359	0	0
w/Y; <i>K81</i> ² / <i>K81</i> ²	y w	311	0	0
w/Y; 5' <i>K81-GFP::K81</i> /	w	265	246	93
5' <i>K81-GFP::K81</i> ; <i>K81</i> ² / <i>K81</i> ²				
w/Y; 5' <i>K81-GFP::K81</i> /	y w	351	342	97.4
5' <i>K81-GFP::K81</i> ; <i>K81</i> ² / <i>K81</i> ²				
w/Y; 5' <i>K81-GFP::K81</i> /+	y w	480	456	95
<i>K81</i> ¹ / <i>K81</i> ¹				
w/Y; 5' <i>K81-GFP::K81</i> /+	y w	518	477	92
<i>K81</i> ² / <i>K81</i> ²				
w/Y; 5' <i>K81-GFP::hiphop</i> [#2]/	y w	315	310	98.4
TM3				
w/Y; 5' <i>K81-GFP::hiphop</i> [#2]/	y w	377	0	0
<i>K81</i> ² / <i>K81</i> ²				
w/Y; 5' <i>K81-GFP::hiphop</i> [#2]/	y w	430	0	0
<i>K81</i> ² /5' <i>K81-GFP::hiphop</i> [#2]				
<i>K81</i> ²				
w/Y; 5' <i>K81-GFP::hiphop</i> [#3]/	y w	512	221	43.2
5' <i>K81-GFP::hiphop</i> [#3]				
w/Y; 5' <i>K81-GFP::hiphop</i> [#3]/	y w	256	0	0
<i>K81</i> ² / <i>K81</i> ²				
w/Y; 5' <i>K81-GFP::hiphop</i> [#3]/	y w	363	0	0
<i>K81</i> ² /5' <i>K81-GFP::hiphop</i> [#3]				
<i>K81</i> ²				
w/Y; 5' <i>hiphop-GFP::K81</i> /	y w	433	2	0.4
<i>K81</i> ² /5' <i>hiphop-GFP::K81</i>				
<i>K81</i> ²				

Males and females of the indicated genotypes were crossed, and embryo hatching rates were calculated as described in the Experimental Procedures. 5'*K81-GFP::hiphop*[#2] and 5'*K81-GFP::hiphop*[#3] are two independent insertions of the same transgene.

K81 Remains Associated with Paternal Telomeres until Zygote Formation

In mature gametes, GFP::*K81* foci were no longer detected, most likely as a consequence of the extreme compaction of sperm nuclei, which are not accessible to antibodies (data not shown and [27]). To determine whether GFP::*K81* was still associated with paternal telomeres after fertilization, we crossed 5'*K81-GFP::K81*; *K81*² males with wild-type females. Eggs laid by these females were stained with an anti-GFP antibody to detect GFP::*K81* after fertilization. Strikingly, GFP::*K81* was systematically detected in the decondensing male pronucleus (*n* = 16), often in one or two foci (Figure 1E). GFP::*K81* was still detected in the male nucleus at pronuclear apposition and during the first zygotic mitosis (Figures 1F–1H). In anaphase of the first nuclear cycle, GFP::*K81* was observed at the extremities of separating paternal sister chromatids, thus confirming the telomere localization of *K81* (Figure 1H). A faint staining of paternally transmitted GFP::*K81* was occasionally detected on paternal chromosomes during the second nuclear division, but never beyond this stage (data not shown).

Because GFP::*K81* rapidly vanished from paternal chromosomes after zygote formation, we wondered whether *K81* was replaced by its sister protein, *HipHop*, in early embryos. Interestingly, the *hiphop* gene shows a strong female-biased expression, and transcripts are very abundant in adult ovaries [26, 28]. We generated transgenic flies expressing a GFP::*HipHop* fusion protein under the regulatory region of *hiphop* (5'*hiphop-GFP::hiphop*; Figure 2A). As expected, the transgene was maternally expressed, and GFP::*HipHop* specifically

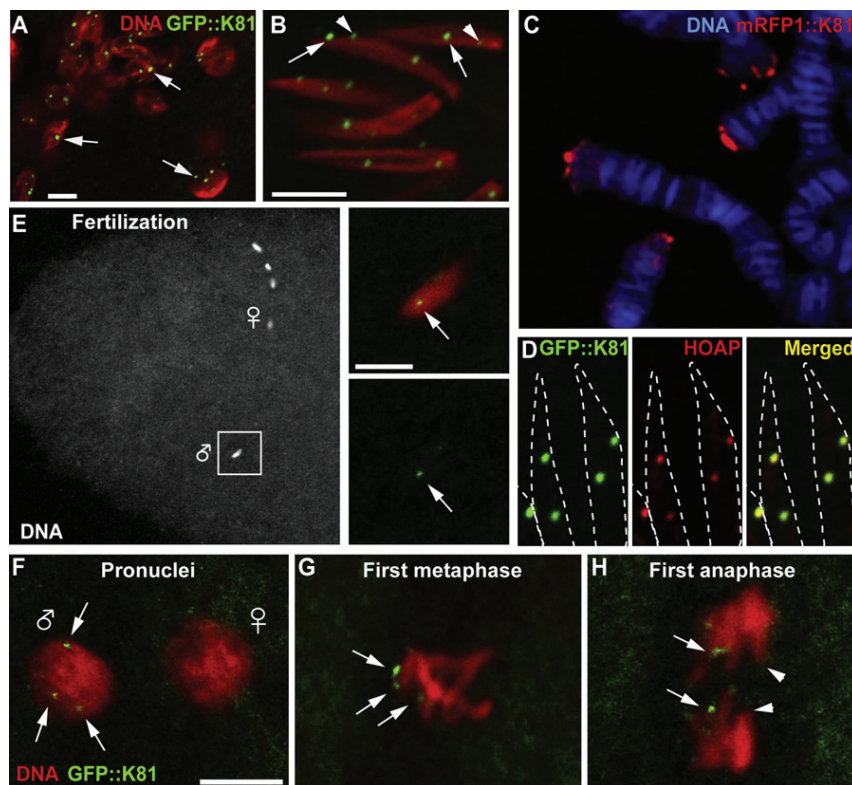


Figure 1. K81 Associates with Paternal Telomeres

(A and B) Confocal images of spermatids from a *5'K81-GFP::K81; K81²* adult testis stained for DNA (red) and GFP (green).

(A) In early, round spermatids, GFP::K81 accumulates in a small number of dots (arrows).

(B) In elongating spermatid nuclei, GFP::K81 is detected in large (arrows) or small (arrowheads) foci.

(C) Polytene chromosomes from *UAS-mRFP1::K81; Sgs3-Gal4* larval salivary glands. mRFP1::K81 (red) specifically localizes at all chromosome extremities.

(D) In spermatid nuclei, GFP::K81 foci (green), detected with an anti-GFP antibody, colocalize with the telomere marker HOAP (red). Spermatid nuclei are outlined.

(E–H) Eggs and early embryos from wild-type females mated with *5'K81-GFP::K81; K81²* rescued males.

(E) A fertilized egg with the four maternal meiotic products visible at the top. The still-elongated male nucleus (inset) contains at least one GFP::K81 focus (arrow).

(F) Male and female pronuclei shortly before apposition. Only the male pronucleus (left) contains GFP::K81 foci (arrows).

(G) First zygotic metaphase: GFP::K81 foci are still associated with paternal chromosomes (arrows).

(H) First zygotic anaphase: the telomere localization of GFP::K81 is visible (arrows). Arrowheads show unlabeled telomeres, presumably from maternal chromatids. Scale bars represent 5 μ m.

associated with telomeres, for instance on polar body chromosomes (Figure 2B). Shortly after fertilization, GFP::HipHop was detected in female meiotic products, but not in the decondensing male pronucleus (Figures 2C and 2D). After the first round of DNA replication, however, GFP::HipHop was associated with both maternal and paternal telomeres (Figure 2E) and then on all embryonic telomeres throughout syncytial development (data not shown).

Taken together, our observations indicate that after fertilization, newly synthesized paternal telomeres are capped with maternally expressed HipHop, whereas paternally transmitted K81 is rapidly diluted during the first embryonic S phases.

K81 Is Necessary for the Association of HP1 and HOAP at Spermatid Telomeres

In *Drosophila* S2 cultured cells, HipHop and HOAP are interdependent for their stability and for their recruitment at telomeres

[14]. The presence of HOAP at spermatid telomeres enabled the possibility that its distribution might be similarly dependent on K81. In wild-type testes, HOAP foci were detected in spermatid nuclei throughout spermiogenesis (Figure 3A). In *K81²* mutant testes, HOAP foci were detected in early, round spermatids (data not shown), but, strikingly, became undetectable in elongating nuclei (Figure 3A). Thus, like HipHop in somatic cells, K81 is required for the maintenance of HOAP at telomeres in differentiating spermatids.

We then aimed to determine whether HP1 was also involved in the capping of spermatid telomeres. In contrast to other capping proteins, HP1 is a multifunctional protein with a complex nuclear distribution in somatic cells, notably including a strong enrichment in pericentric heterochromatin [11, 18, 29]. In secondary spermatocytes, HP1 was detected throughout the nucleus and was also enriched at telomeres, as revealed by its colocalization with HOAP (Figure 3B;

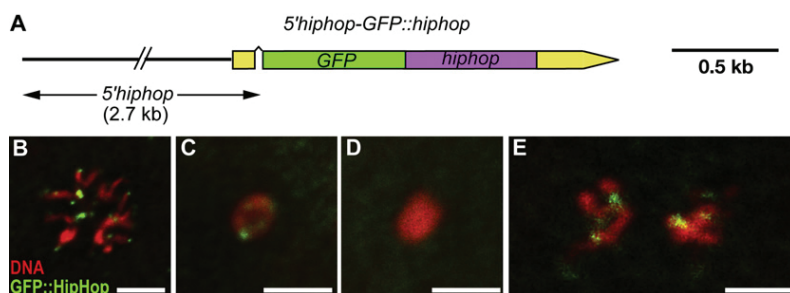


Figure 2. HipHop Distribution in Eggs and Early Embryos

(A) Representation of the *5'hiphop-GFP::hiphop* transgene. This construct contains a 2.7 kb fragment of genomic DNA (*5'hiphop*) immediately upstream of the *hiphop* coding sequence. A single copy of this transgene fully rescues the lethality associated with *hiphop* mutant alleles (see Figure 4).

(B–E) Confocal images of early embryos stained for DNA (red) and GFP::HipHop (green).

(B) Polar body.

(C) Migrating female pronucleus.

(D) Male pronucleus from the same egg.

(E) First metaphase.

HipHop is absent from the male pronucleus but is detected on both paternal and maternal telomeres at the first metaphase. Scale bars represent 5 μ m.

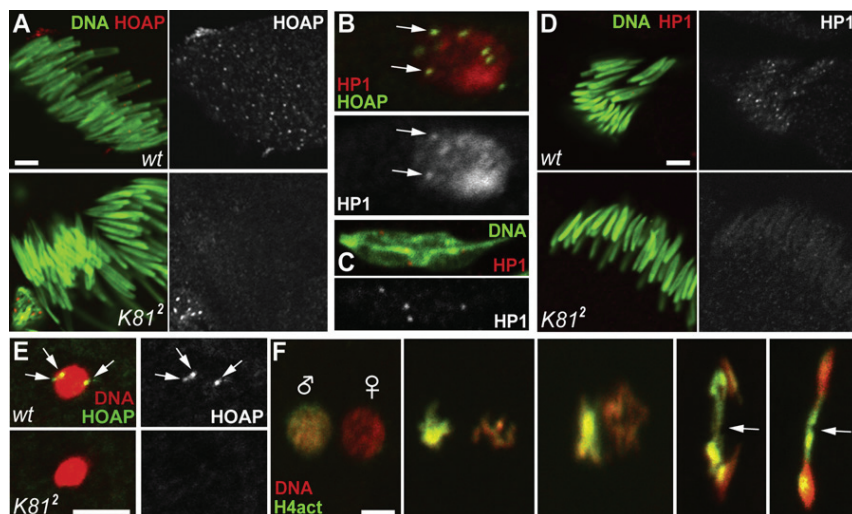


Figure 3. K81 Maintains Capping Proteins at Sperm Telomeres

(A) Confocal images of testes from wild-type or *K81*² mutant males stained for HOAP (red) and DNA (green). HOAP is detected at telomeres in wild-type (wt) but not *K81*² mutant elongating spermatid nuclei. Note that the HOAP foci visible in the *K81*² panels are from a somatic cell.

(B) In secondary spermatocyte nuclei, HP1 (red) has a broad nuclear distribution but appears to be enriched at telomeres (arrows), where it colocalizes with HOAP (green).

(C) In elongating spermatid nuclei, HP1 is only restricted to telomeres (see also Figure S1).

(D) Like HOAP, HP1 is not maintained at spermatid telomeres in *K81*² mutant testes.

(E) In eggs fertilized with wild-type sperm, HOAP is detected at telomeres in the decondensing male pronucleus (arrows; *n* = 27), whereas in eggs fertilized with sperm from *K81*² mutant males, HOAP is never detected in the male pronucleus (*n* = 17).

(F) Paternal chromosomes fail to divide normally

in eggs fertilized with *K81* sperm. From left to right: pronuclear apposition, first metaphase, early anaphase, late anaphase, and telophase. The paternal chromatin is stained with an anti-acetylated H4 histone antibody (green) [27]. Paternal chromatin bridges are visible in late anaphase and telophase (arrows). Scale bars represent 5 μ m.

see also Figure S1 available online). Surprisingly, however, after meiosis, HP1 distribution in spermatid nuclei became restricted to a few foci that colocalized with GFP::K81 (Figure 3C and data not shown). In addition, we verified that none of the four centromeres of these haploid nuclei colocalized with HP1 or GFP::K81 (Figure S1). Thus, HP1 is specifically retained at telomeres in spermatids, whereas it is completely removed from other genomic regions during spermiogenesis, including pericentric heterochromatin. In *K81*² mutant testes, however, HP1 foci were no longer detected in elongating spermatids, similar to HOAP (Figure 3D). Therefore, K81 is necessary for the association of HP1 at telomeres, thus underlining the similar roles of HipHop and K81 in capping complex formation in somatic cells and spermatids, respectively.

The presence of HOAP and HP1 at spermatid telomeres suggested that these capping proteins, like K81, were transmitted to paternal chromosomes at fertilization. Although the diffuse distribution of HP1 in the male pronucleus did not permit us to draw conclusions about its association with telomeres at this stage (data not shown), HOAP foci were clearly detected in decondensing male pronuclei (Figure 3E). As expected, we never observed HOAP foci in the male pronuclei transmitted by *K81*² mutant fathers (Figure 3E). Together, these data demonstrate that K81 is required for the maintenance of the HP1 and HOAP capping proteins at paternal telomeres before and after fertilization.

In the absence of HOAP and HP1 in somatic cells, unprotected telomeres frequently fuse, resulting in bridges of chromatin in anaphase [11, 17]. Interestingly, in eggs fertilized by sperm from *K81*² mutant males, paternal chromosomes fail to separate in anaphase [21, 24] and form a chromatin bridge that ultimately connects the dividing nuclei in telophase (Figure 3F). We thus propose that the *K81* paternal effect phenotype results from the fusion of uncapped paternal chromosomes prior to the first zygotic mitosis.

HipHop and K81 Are Not Functionally Equivalent

HipHop and K81 proteins display 53% amino acid identity (Figure S2) and are both involved in the maintenance of capping proteins at telomeres in their respective expression domain.

We thus addressed the question of whether the two proteins have remained interchangeable or have functionally diverged since the gene duplication. We therefore tested the ability of HipHop and K81 to complement one another in vivo. As expected from its molecular function, *hiphop* is an essential gene. Indeed, all animals transheterozygous for two non-complementing *P* element insertions in *hiphop* (*hiphop*¹/*hiphop*^{EY07584}) died before the second larval stage (Figure 4A and data not shown). A copy of the 5'*hiphop*-GFP::*hiphop* transgene fully restored the viability of this allelic combination, thus confirming that the observed lethality was caused by *hiphop* loss of function (Figure 4B). We then replaced *hiphop* with the K81 coding region in the same construct to generate 5'*hiphop*-GFP::*K81* transgenic flies. Importantly, this construct was inserted at the same genomic position as the 5'*hiphop*-GFP::*hiphop* transgene to achieve identical expression levels (see Experimental Procedures). We verified that, in larval salivary glands, both GFP::HipHop and GFP::K81 similarly localized at telomeres on polytene chromosomes (Figure 4B). Strikingly, however, the 5'*hiphop*-GFP::*K81* transgene had no effect on *hiphop* mutant lethality (Figure 4B), thus demonstrating that K81 cannot functionally replace HipHop.

In a mirror experiment, GFP::HipHop was expressed under the *K81* regulatory region (5'*K81*-GFP::*hiphop*). Three independent insertions of this construct drove robust expression of GFP::HipHop in the male germline (data not shown). In testes from these transgenic animals, GFP::HipHop was detected as nuclear foci in spermatids in a way that was identical to GFP::K81 (Figure 4C). However, none of these transgenic insertions rescued *K81* male sterility (Table 1 and Figure 4C). We verified that the 5'*K81*-GFP::*hiphop*, *K81*² males induced a typical *K81* paternal effect embryonic phenotype, characterized by a systematic bridging of paternal chromatin during the first mitosis (data not shown). Furthermore, although GFP::K81 was systematically detected in the decondensing male pronucleus, paternally expressed GFP::HipHop, in clear contrast, was not retained on paternal chromatin after fertilization (Figure 4D). Hence, we conclude that HipHop cannot replace K81 for the protection of paternal telomeres in the male germline.

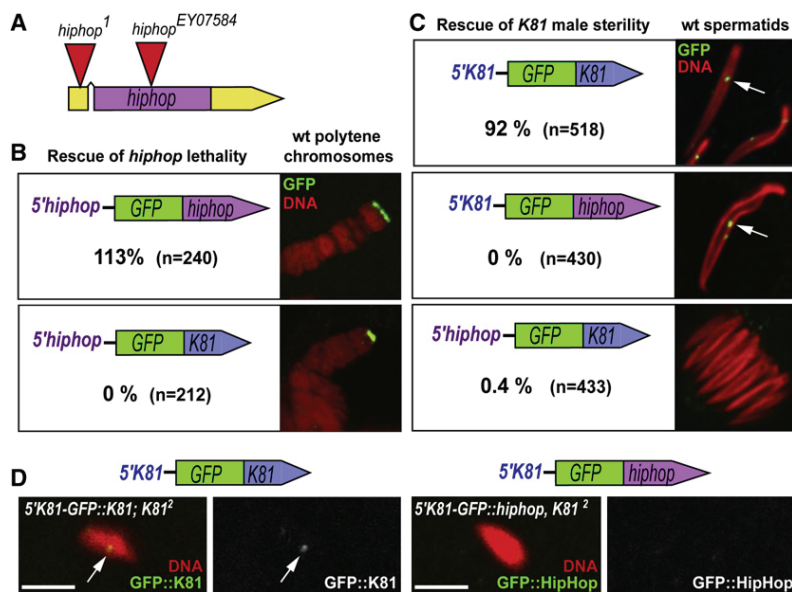


Figure 4. HipHop and K81 Have Functionally Diverged
(A) Representation of *hiphop*¹ and *hiphop*^{EY07584} lethal *P* element insertion alleles (red triangles) used in (B). Untranslated and coding regions are shown in yellow and purple, respectively.

(B) Rescue experiments of *hiphop* lethality with the indicated transgenes. The percentages indicate the fraction of rescued transgenic *hiphop*¹/*hiphop*^{EY07584} adults over the expected 1/3 Mendelian ratio for this genotype (see Experimental Procedures). The localization of GFP fusion proteins (green) on polytene chromosomes (red) is shown for each transgene. n denotes total number of adult progeny obtained from the cross.

(C) Rescue experiments of K81 male sterility with the indicated transgenes. Hatching rates of embryos from K81² homozygous mutant males with two copies of the indicated transgene are shown (see Experimental Procedures). For each transgene, the localization of GFP fusion proteins on spermatid nuclei is shown. n denotes total number of embryos.

(D) GFP::K81 is detected in the male pronucleus (arrows) in eggs fertilized with sperm from 5'K81-GFP::K81; K81² rescued males (n = 16), whereas GFP::HipHop is never detected in eggs fertilized with sperm from 5'K81-GFP::hiphop; K81² males (n = 15). Scale bars represent 5 μ m.

HipHop Fails to Maintain Capping Proteins at Telomeres during the Histone-to-Protamine Transition

To better understand the basis of the functional divergence of K81 and HipHop, we studied the distribution of HOAP and HP1 during the course of spermatid differentiation in 5'K81-GFP::hiphop, K81² males. During spermiogenesis, the canoe stage is characterized by the massive replacement of histones with sperm-specific chromosomal proteins, such as

protamines and Mst77F [30]. To study the distribution of capping proteins during this process, we costained testes for HOAP or HP1 and Mst77F, which is deposited in spermatid nuclei at the onset of histone removal [31, 32]. In control testes, HP1 and HOAP foci were detected in early and in late canoe stage spermatid nuclei that had already begun to incorporate Mst77F (Figures 5A and 5B, left panels). In K81² mutant testes expressing GFP::HipHop, HOAP and HP1 foci were only

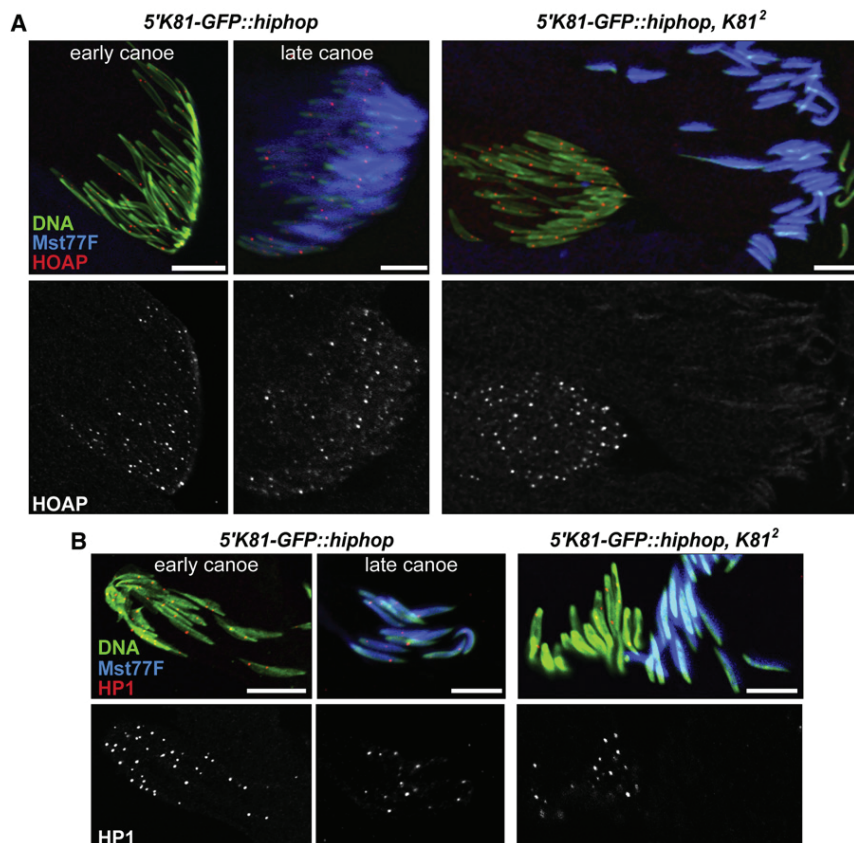


Figure 5. HipHop Cannot Maintain HOAP and HP1 at Telomeres during Sperm Chromatin Remodeling

(A) In 5'K81-GFP::hiphop control testes, HOAP (red) is detected in early and in late canoe spermatid nuclei that have already incorporated the Mst77F (blue) sperm chromatin protein (left panels). In 5'K81-GFP::hiphop; K81² testes, HOAP foci are only detected in spermatid nuclei that have not yet incorporated Mst77F (right panels). Note that the Mst77F staining is used as an internal control for antibody accessibility in spermatid nuclei.

(B) Similarly, HP1 is detected only in early canoe spermatid nuclei of 5'K81-GFP::hiphop, K81² testes (right panels). Scale bars represent 10 μ m.

observed in early canoe spermatid nuclei that were negative for Mst77F (Figures 5A and 5B, right panels). Indeed, the loss of these foci was correlated with the onset of Mst77F deposition in condensing spermatid nuclei.

Hence, although GFP::HipHop is able to initially recruit HOAP and HP1 at spermatid telomeres in the absence of K81, the capping complex is not maintained during the global chromatin remodeling of spermatid nuclei. It thus suggests that K81 specialized to cap telomeres in the highly peculiar chromatin environment of maturing male gametes.

Discussion

K81 and the Epigenetic Protection of Telomeres in the Male Germline

We have shown that K81 encodes a new telomere capping protein required for the transmission of functional paternal chromosomes to the diploid zygote. This finding elucidates the origin of the unique paternal effect lethal phenotype associated with *K81*. To our knowledge, K81 is the first identified *Drosophila* telomere protein specifically expressed in the male germline. In fact, the structure and organization of telomeres in *Drosophila* male germ cells have remained largely unexplored. We show in this study that during spermiogenesis, K81 accumulates in a small number of foci, where it is systematically associated with the HOAP and HP1 capping proteins. In contrast to HOAP, which is essentially a telomere-specific protein, HP1 is mainly enriched in pericentric heterochromatin in somatic nuclei. In addition, HP1 is also detected at telomeres and at numerous euchromatic sites on polytene chromosomes [11, 18]. In this regard, it is remarkable that HP1 is only retained at telomeric regions in spermatid nuclei, suggesting that its sole function in differentiating male germ cells is in capping telomeres. The lethality associated with *cav* (encoding HOAP) and *Su(var)205* (encoding HP1) loss-of-function mutant alleles prevents us from directly testing their respective roles during spermiogenesis. Our study shows, however, that both HOAP and HP1 are lost from spermatid telomeres in *K81* mutant testes. This loss of telomere capping proteins does not interfere with male gamete differentiation and maturation. Instead, the *K81* mutant phenotype manifests itself only after fertilization and results in the incapacity of paternal chromosomes to segregate during the first zygotic mitosis. This initial defect leads to the formation of aneuploid embryos, which arrest development after a few abnormal nuclear divisions, or to the occasional escaping of haploid gynogenetic embryos that die shortly before hatching [21, 22, 24]. The systematic and specific bridging of paternal chromatin during the first anaphase most likely results from the presence of chromosome end-to-end fusions. Although telomere fusions can be easily observed in cultured cells or in squashed preparations of larval brains, where they form chains of connected chromosomes [9], these defects appeared to be very difficult to observe in detail in *Drosophila* zygotes. Nonetheless, chromatin bridges associated with telomere dysfunction have been reported in syncytial embryos from mothers bearing hypomorphic alleles of *mre11* or *nbs* [33], thus indicating that the DNA repair machinery presumably responsible for the fusion of uncapped telomeres is already active during early cleavage divisions.

The distribution of telomere capping protein foci in spermatid nuclei indicates that telomeres tend to associate within clusters during spermiogenesis. Interestingly, telomere clustering seems to be a conserved feature of animal

spermiogenesis, such as in mammals, in which telomeres from the same chromosome are frequently associated in pairs [34, 35]. In *Drosophila*, telomere clustering is apparently the rule in late spermatids, as well as in the decondensing male pronucleus, because we frequently observed a single major focus of capping proteins in these nuclei. It is likely that this spectacular gathering of telomeres in a limited nuclear volume could favor the occurrence of paternal chromosome end-to-end fusions in *K81* mutants.

Diversification of the *hiphop/K81* Gene Family

Despite their critical role in chromosome protection, telomere proteins are rapidly evolving from yeasts to mammals [2, 36–38]. This tendency is observed in *Drosophila*, where important capping proteins such as HOAP, Verrocchio, Modigliani, and HipHop are encoded by fast-evolving genes [14, 20, 39]. We had previously shown that *K81* is a relatively young gene that is restricted to the nine species comprising the *melanogaster* subgroup [21]. *K81* originated after the duplication of its paralog, *hiphop* (originally known as *CG6874/[(3)neo26]*), presumably through a retroposition mechanism. The predicted *K81* transcription start site is only about 100 bp from the 5' end of the *Rb97D* gene, which is expressed in primary spermatocytes and is required for male fertility [40, 41]. The selection of both *hiphop* and *K81* genes was thus likely favored by the immediate acquisition of male germline-specific expression of the duplicated copy, after its landing close to *Rb97D*, followed by loss of *hiphop* expression in this lineage [21]. In a less parsimonious, alternative scenario, an ancestral male germline-specific *hiphop* gene could have evolved a somatic and female germline expression following the duplication. However, this possibility does not fit with the expected requirement of HipHop for telomere protection in somatic cells. Interestingly, with a single exception (see below), all *Drosophila* sequenced species outside the *melanogaster* subgroup have a single member of the *hiphop/K81* gene family (Figure 6). For instance, *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, and *D. persimilis* have *hiphop* with the same conserved synteny as in *melanogaster* species but lack *K81* (Figure 6). In these three species, *hiphop* is thus expected to protect telomeres in all cells, including male germ cells. Most interestingly, phylogenetic analysis reveals the existence of a second, independent duplication of *hiphop* in the lineage leading to *D. willistoni* (Figure 6). Moreover, this *D. willistoni* *hiphop* duplicate presents a male-biased expression (Figure S3), allowing the possibility that it could be required in the male germline, like *K81* in *D. melanogaster*. Although functional studies are not currently feasible in non-*melanogaster* species, developmental in situ expression analysis of members of this gene family may support these predictions.

Functional Divergence of HipHop and K81

In their respective cellular environments, HipHop and K81 are both specifically localized at telomeres, and they are required for the maintenance of the HOAP and HP1 capping proteins at chromosome ends. However, and despite the apparently identical molecular functions of K81 and HipHop, our experiments demonstrate that they cannot replace one another in vivo. When ectopically expressed in the male germline, GFP::HipHop is able to transiently restore the localization of HOAP and HP1 at spermatid telomeres in a *K81* mutant background. In this genetic context, telomeres remained capped until the global replacement of histones with sperm-specific nuclear proteins. What actually triggers the loss of HipHop, HP1, and

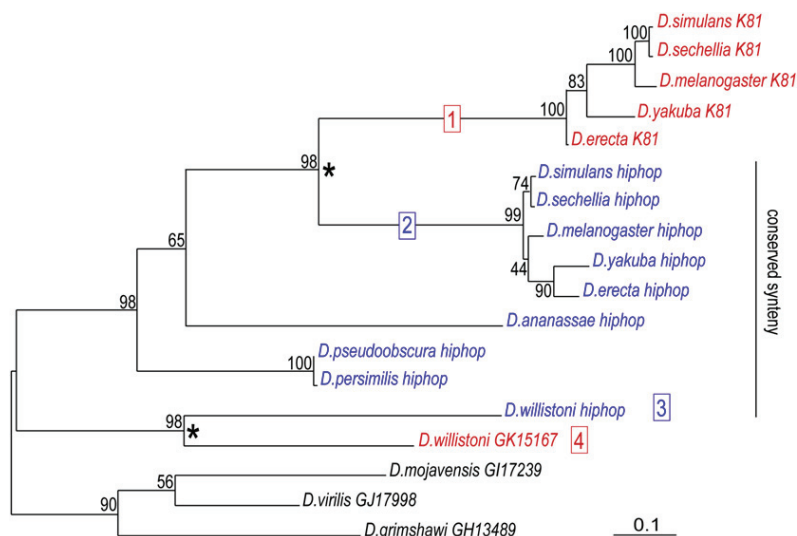


Figure 6. Phylogenetic Tree of the *hiphop*/K81 Gene Family

This tree was obtained from a Gblocked alignment of the *hiphop*/K81 CDS using the PhyML phylogenetic program (GTR model with a gamma distribution and four site categories) in Seaview (see Experimental Procedures). Results of nonparametric bootstrap (100 replicates) are shown. This tree indicates the occurrence of two *hiphop* independent duplication events (asterisks). All the *hiphop* genes in blue have conserved synteny. *hiphop* paralogs are shown in red. Numbers in boxes indicate the focal lineages in the *dN/dS* analysis (see Table S1). Gene annotation symbols not shown in the tree: *Drosophila melanogaster* K81: CG14251; *D. simulans* K81: GD21311; *D. sechellia* K81: GM10349; *D. yakuba* K81: GE23697; *D. erecta* K81: GG11507; *D. melanogaster* *hiphop*: CG6874; *D. simulans* *hiphop*: GD14769; *D. sechellia* *hiphop*: GM14992; *D. yakuba* *hiphop*: GE19974; *D. erecta* *hiphop*: GG13678; *D. ananassae* *hiphop*: GF10272; *D. pseudoobscura* *hiphop*: GA19922; *D. persimilis* *hiphop*: GL24882; *D. willistoni* *hiphop*: GK12110. Bar denotes number of substitution per nucleotide (see also Figure S3, Figure S4, and Table S1).

HOAP in these spermatids is not known. The fact that these proteins disappear concomitantly with the onset of global spermatid chromatin remodeling suggests a causal link, although this remains to be established. In mammals, although telomere integrity in male gametes is essential for zygote formation [42], little is known about the organization of telomeres in germ cells. However, a few studies point to the peculiar composition of telomere complexes in human sperm [35, 43], suggesting that the unique organization of sperm chromatin imposes constraints on the structure and function of telomeres. Similarly, our study suggests that K81 specialized in the epigenetic maintenance of telomere identity in the highly peculiar chromatin environment of male gametes. This scenario also implies that HipHop lost its ability to protect sperm telomeres after the emergence of K81 function. Phylogenetic analysis of the *hiphop* and K81 coding sequences actually supports this subfunctionalization scenario. First, *hiphop* and K81 genes show a symmetrical acceleration of evolution in the *melanogaster* subgroup of species (Figure 6 and Table S1). Second, synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution analysis of the coding sequences indicates that *hiphop* and K81 evolved under purifying selection (Figure S4 and Table S1). Finally, K81 expression in somatic cells does not rescue the zygotic lethality of *hiphop* mutants, thus confirming the functional divergence of both proteins.

The maternal expression of *hiphop* is apparently sufficient to protect telomeres during embryo development, as observed with mutations in other telomere capping genes [10]. Accordingly, we have shown that maternally expressed GFP::HipHop decorates both paternal and maternal telomeres as soon as the diploid zygote is formed. However, the early larval zygotic lethality of *hiphop* mutants prevented a more detailed in vivo phenotypic analysis using third instar larvae polytene chromosomes or neuroblast mitotic chromosomes. Although both mRFP1::K81 and GFP::K81 are fully able to associate with somatic telomeres, these experiments could only be carried out in a wild-type *hiphop* genetic background, for the reasons mentioned above. We thus do not currently know whether K81 associates with somatic telomeres autonomously or through its association with other capping proteins, such as HOAP and/or HP1, in a HipHop-dependent manner.

As discussed above, the functional divergence of HipHop and K81 could reflect their adaptation to different chromatin environments. However, as new *Drosophila* telomere proteins are regularly discovered, it is also reasonable to consider the possibility that K81 and HipHop require one or more yet-unknown protein partners to function properly. For instance, K81 could not protect telomeres in somatic cells if its capping activity requires another factor only expressed in spermatids. Interestingly, the HP1-related protein Umbrea/HP6 [29, 44], which has been recently proposed to function in telomere protection [45], is mainly expressed in the adult testis [26]. Future studies should thus aim at determining whether other capping proteins are specialized in the protection of telomeres in germ cells, like K81.

In conclusion, our study demonstrates that HipHop and K81 diverged not only in their domain of expression, but also in their ability to protect telomeres in their respective cellular environments. A challenge will be to understand the nature of the evolutionary pressure that ultimately shaped the diversification of the *hiphop*/K81 gene family in the genus *Drosophila*.

Experimental Procedures

Drosophila Strains

w¹¹¹⁸ and *y¹ w^{67c}* strains were used as controls. Unless otherwise noted, we used the K81² (or *Df(3R)ms(3)K81-2*) allele, a small deficiency that completely deletes the K81 gene [24]. The original K81¹ allele has been previously characterized [21]. The *hiphop*¹ allele (*P{hsneo}hiphop¹*) [46] was obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center. The *hiphop*^{EY07584} (*P{EPgy2}hiphop^{EY07584}*) allele is a *P* element insertion at genomic position 18814719 and was kindly provided by Hugo Bellen [47]. The *gcid-EGFP::cid* line is a gift from Stefan Heidmann [48]. The 5'K81-GFP::K81 and 5'K81-GFP::hiphop transgenic stocks were obtained by standard *P* element-mediated germline transformation. The 5'hiphop-GFP::hiphop, 5'hiphop-GFP::K81, and UAS-mRFP1::K81 constructs were inserted into the PBAC[y(+)-attP-3B]VK00031 platform (62E1) using the ϕ C31-mediated integration system [49].

Fertility Tests

Males and virgin females were allowed to mate for 2 days before overnight egg collection. Eggs were counted and allowed to develop at 25°C for 48 hr. Hatched larvae were then counted to determine hatching rates.

hiphop Complementation Tests

5'hiphop-GFP::hiphop, hiphop¹/TM3, Sb or 5'hiphop-GFP::K81, hiphop¹/TM3, Sb flies were crossed to hiphop^{EY07584}/TM3, Sb flies. The number of flies for each expected genotype was counted in the progeny.

Immunofluorescence and Imaging

Polytene Chromosomes

Samples were prepared as previously described [50]. Primary antibodies were rabbit polyclonal anti-RFP (Clontech) or mouse monoclonal anti-GFP (Roche), diluted at a 1:250 and 1:15 dilution, respectively. Alexa Fluor (Molecular Probes) or DyLight (Jackson ImmunoResearch) conjugated secondary antibodies were used at a 1:300 dilution.

Testes

All testes were squashed for immunostaining except for the anti-Cid staining (Figure S1). In this case, whole-mount testes were stained as previously described [27] with an anti-Cid antibody (Abcam) at a 1:2000 dilution. The protocol for squashing testes was adapted from [51] with a few modifications. Briefly, five to six testes per genotype were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min and then in 50% acetic acid for 2–3 min before squashing. Immunostainings were done as described above for polytene chromosome preparations, except that blocking was done in 1% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline. We used mouse anti-GFP (Roche) (1:100), guinea pig anti-HOAP [14] (1:200), mouse anti-HP1 (Developmental Studies Hybridoma Bank) (1:100), and rabbit anti-Mst77F (1:1000) [30] primary antibodies. Secondary antibodies were used at a 1:300 dilution.

Samples were mounted in mounting medium (Dako) containing 5 µg/ml propidium iodide (Sigma) or 1 mM YO-PRO-1 (Molecular Probes).

Eggs

Eggs were collected every 30 min, fixed, and stained as previously described [52]. Rabbit anti-GFP (Invitrogen), rabbit anti-acetylated histone H4 (Upstate), or guinea pig anti-HOAP primary antibodies were used at a 1:200 dilution, and corresponding secondary antibodies were used at 1:500.

All confocal images were obtained using an LSM 510 confocal microscope (Zeiss) and were processed using Photoshop (Adobe).

Plasmid Constructs

We used pW8 and pUASP vectors and modified them to obtain a pW8-attB and a pUASP-attB vector, allowing targeted insertion in the 62E1 platform located on chromosome 3L. Plasmid constructs were then done as follows.

UAS-mRFP1::K81

The pUASP-mRFP1::K81 construction was obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the K81 and mRFP1 full-length coding sequences and cloning into the pUASP-attB vector. The following primers containing, respectively, the NotI and BamHI restriction sites were used to amplify K81: 5'-CTAGCGGCCGCCATGTCGGATTCGC-3' and 5'-TGGATC CACATTATCCCCAGTAGTTC-3'. The primers 5'-CTAGCGGCCGCCACCATGGCTCCTCCGAGGACG-3' and 5'-CATTTAGCGGCCGCCGCGGTGGAGTGGCGG-3', both containing NotI, were used to amplify mRFP1.

GFP::K81 and GFP::hiphop Transgenes

The GFP coding sequence was excised from a previously engineered construct (pGEM-T-GFP) using the SacII and NotI restriction sites and was cloned into the pW8 (for the 5'K81-GFP::K81 and 5'K81-GFP::hiphop constructs) or the pW8-attB (for the 5'hiphop-GFP::hiphop and 5'hiphop-GFP::K81 constructs) vector. Then cloning of the hiphop and K81 upstream regions and coding sequences was done as follows.

5'K81-GFP::K81

A 555 bp and 674 bp fragment covering, respectively, the complete K81 coding sequence (CDS) and upstream sequences (666 bp) were amplified from yw genomic DNA and subcloned into the pGEM-T vector. The following primers, 5'-CTAGCGGCCGCCATGTCGGATTCGC-3' and 5'-TGGATCCACATTATCCCCAGTAGTTC-3' for the K81 CDS, were designed to introduce NotI and BamHI restriction sites, whereas each of the K81 promoter primers, 5'-CCGCGGGATAACATCGACCACCTTGCCCC-3' and 5'-CCGCGGCCATTAGAAGTTAAGTTGAATCTC-3', contains a SacII restriction site.

5'hiphop-GFP::hiphop

A 2729 bp fragment covering the regulating sequence of the hiphop gene, including the 5' untranslated region and the first intron, was amplified by PCR from yw genomic DNA and subcloned into a pGEM-T vector (Promega) using the following primers that both contain the SacII restriction site: 5'-TCTTATCCGCGGACTCAGTAGAATGTTAAGG-3' and 5'-ATGTTA CCGCGGCTGGAATAGATCATGCACC-3'. Similarly, a 1519 fragment containing the coding sequence of hiphop was amplified and subcloned into

a pGEM-T vector. Primers used were 5'-CTAGCGGCCGCCATGGCCTCATTGACGAGG-3' and 5'-TGGATCCAGTCAATCAACTGATTGGAAGC-3', which introduce NotI and BamHI restriction sites, respectively. Both inserts were then excised and cloned into the pW8-attB-GFP construct.

5'K81-GFP::hiphop and 5'hiphop-GFP::K81

The coding sequences of the hiphop and K81 genes from the 5'hiphop-GFP::hiphop and 5'K81-GFP::K81 constructs described above were exchanged using the NotI and BamHI restriction sites.

Reverse Transcription Analysis

Total RNAs from adult *Drosophila willistoni* males or females were extracted using the Trizol method (Invitrogen). cDNAs were synthesized using oligo-dT primers and the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). The following sets of primers were used to amplify hiphop (gene annotation symbol GK12110) and its paralog (gene annotation symbol GK15167), respectively: 5'-CTGTATTGATACATTTTC-3' and 5'-AACTTCGTTGATTAGC-3', 5'-CGAACAAATTGAGAAATGC-3' and 5'-CTGTATATTGGTAGTCGC-3'. Primers designed to amplify the *D. melanogaster* Rp49 gene (5'-AAGATCGTGAAGAAGCGCAC-3' and 5'-ACTCGTCTCTTGAGAAGC-3') were used to amplify the *willistoni* Rp49 gene as a control.

Alignment and Phylogenetic Trees

The hiphop/K81 CDSs were aligned using the MUSCLE algorithm in Seaview [53]. The alignment was then cleaned using Gblock in the permissive mode (see <http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks.html>) [54]. A maximum-likelihood tree was built using the PhyML algorithm in Seaview with the general time-reversible (GTR) model, a gamma distribution (four site categories), an estimated alpha parameter, an estimated percentage of invariants, an estimated transition/transversion rate, and a nonparametric bootstrapping [53].

Evolutionary Rates Analysis

Site Model Analysis

We ran Datamonkey (one of the HyPhy modules, see <http://www.datamonkey.org/>) on the hiphop/K81 raw alignment and retrieved the d_N-d_S output for each site of the alignment [55].

Branch Model Analysis

We ran codeml on the hiphop/K81 Gblocked alignment. The phylogenetic tree of the hiphop/K81 gene family was slightly modified to be fully consistent with the 12 *Drosophila* Species tree [56]. We tried various nested models (with up to four d_N/d_S ratios) and compared these models using the likelihood ratio test approach.

Branch-Site Analysis

We ran fitmodel on the hiphop/K81 raw alignment and the same phylogenetic tree as for the branch model analysis [57] with the M2a model (three site categories) and with the possibility of switching from one category to another during evolution (model S1). The wbest output file was analyzed, and we counted the number of sites with evidence for switching in relevant lineages.

Supplemental Information

Supplemental Information includes four figures and one table and can be found with this article online at doi:10.1016/j.cub.2010.11.013.

Acknowledgments

We are grateful to Yikang Rong, Renate Renkawitz-Pohl, Roger Tsien, Hugo Bellen, Stefan Heidmann, and the Bloomington *Drosophila* Stock Center for antibodies, plasmids, and fly stocks. We thank Béatrice Horard for critical reading of the manuscript and Laure Sapey-Triomphe for technical assistance. Confocal microscopy was performed with the help of the Centre Technologique des Microstructures of the University Claude Bernard Lyon 1. This work was supported by the CNRS, the French Ministry of Research, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0139-01).

Received: September 27, 2010

Revised: October 28, 2010

Accepted: November 2, 2010

Published online: November 18, 2010

References

- Chan, S.R., and Blackburn, E.H. (2004). Telomeres and telomerase. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359, 109–121.
- Palm, W., and de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 42, 301–334.
- O'Sullivan, R.J., and Karlseder, J. (2010). Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 171–181.
- Giraud-Panis, M.J., Pisano, S., Poulet, A., Le Du, M.H., and Gilson, E. (2010). Structural identity of telomeric complexes. *FEBS Lett.* 584, 3785–3799.
- Sasaki, T., and Fujiwara, H. (2000). Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *Eur. J. Biochem.* 267, 3025–3031.
- Pardue, M.L., and DeBaryshe, P.G. (2003). Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 37, 485–511.
- Mason, J.M., Frydrychova, R.C., and Biessmann, H. (2008). *Drosophila* telomeres: An exception providing new insights. *Bioessays* 30, 25–37.
- Cenci, G., Ciapponi, L., and Gatti, M. (2005). The mechanism of telomere protection: A comparison between *Drosophila* and humans. *Chromosoma* 114, 135–145.
- Pimpinelli, S. (2006). *Drosophila* telomeres. In *Telomeres, Volume 45*, 2nd Edition, T.L. De Lange, V. Lundblad, and E. Blackburn, eds. (Woodbury, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 433–459.
- Rong, Y.S. (2008). Telomere capping in *Drosophila*: Dealing with chromosome ends that most resemble DNA breaks. *Chromosoma* 117, 235–242.
- Fanti, L., Giovinazzo, G., Berloco, M., and Pimpinelli, S. (1998). The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol. Cell* 2, 527–538.
- Perrini, B., Piacentini, L., Fanti, L., Altieri, F., Chichiarelli, S., Berloco, M., Turano, C., Ferraro, A., and Pimpinelli, S. (2004). HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol. Cell* 15, 467–476.
- Titen, S.W., and Golic, K.G. (2010). Healing of euchromatic chromosome breaks by efficient de novo telomere addition in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 184, 309–312.
- Gao, G., Walser, J.C., Beaucher, M.L., Morciano, P., Wesolowska, N., Chen, J., and Rong, Y.S. (2010). HipHop interacts with HOAP and HP1 to protect *Drosophila* telomeres in a sequence-independent manner. *EMBO J.* 29, 819–829.
- Oikemus, S.R., Queiroz-Machado, J., Lai, K., McGinnis, N., Sunkel, C., and Brodsky, M.H. (2006). Epigenetic telomere protection by *Drosophila* DNA damage response pathways. *PLoS Genet.* 2, e71.
- Shareef, M.M., King, C., Damaj, M., Badagu, R., Huang, D.W., and Kellum, R. (2001). *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex (ORC) protein is associated with HP1 and ORC and functions in heterochromatin-induced silencing. *Mol. Biol. Cell* 12, 1671–1685.
- Cenci, G., Siriaco, G., Raffa, G.D., Kellum, R., and Gatti, M. (2003). The *Drosophila* HOAP protein is required for telomere capping. *Nat. Cell Biol.* 5, 82–84.
- James, T.C., Eissenberg, J.C., Craig, C., Dietrich, V., Hobson, A., and Elgin, S.C. (1989). Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur. J. Cell Biol.* 50, 170–180.
- Raffa, G.D., Siriaco, G., Cugusi, S., Ciapponi, L., Cenci, G., Wojcik, E., and Gatti, M. (2009). The *Drosophila* modigliani (moi) gene encodes a HOAP-interacting protein required for telomere protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 2271–2276.
- Raffa, G.D., Raimondo, D., Sorino, C., Cugusi, S., Cenci, G., Cacchione, S., Gatti, M., and Ciapponi, L. (2010). Verrocchio, a *Drosophila* OB fold-containing protein, is a component of the terminin telomere-capping complex. *Genes Dev.* 24, 1596–1601.
- Loppin, B., Lepetit, D., Dorus, S., Couble, P., and Karr, T.L. (2005). Origin and neofunctionalization of a *Drosophila* paternal effect gene essential for zygote viability. *Curr. Biol.* 15, 87–93.
- Fuyama, Y. (1984). Gynogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Jpn. J. Genet.* 59, 91–96.
- Fuyama, Y. (1986). Genetics of Parthenogenesis in *DROSOPHILA MELANOGASTER*. I. the Modes of Diploidization in the Gynogenesis Induced by a Male-Sterile Mutant, ms(3)K81. *Genetics* 112, 237–248.
- Yasuda, G.K., Schubiger, G., and Wakimoto, B.T. (1995). Genetic characterization of ms (3) K81, a paternal effect gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 140, 219–229.
- Fuller, M.T. (1993). Spermatogenesis. In *The Development of Drosophila melanogaster, Volume 1*, M. Bate and A.M. Arias, eds. (Woodbury, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 71–147.
- Chintapalli, V.R., Wang, J., and Dow, J.A. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat. Genet.* 39, 715–720.
- Bonnefoy, E., Orsi, G.A., Couble, P., and Loppin, B. (2007). The essential role of *Drosophila* HIRA for de novo assembly of paternal chromatin at fertilization. *PLoS Genet.* 3, 1991–2006.
- Pröschel, M., Zhang, Z., and Parsch, J. (2006). Widespread adaptive evolution of *Drosophila* genes with sex-biased expression. *Genetics* 174, 893–900.
- Vermaak, D., and Malik, H.S. (2009). Multiple roles for heterochromatin protein 1 genes in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 43, 467–492.
- Rathke, C., Barckmann, B., Burkhard, S., Jayaramaiah-Raja, S., Roote, J., and Renkawitz-Pohl, R. (2010). Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 326–338.
- Jayaramaiah Raja, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2005). Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6165–6177.
- Rathke, C., Baarends, W.M., Jayaramaiah-Raja, S., Bartkuhn, M., Renkawitz, R., and Renkawitz-Pohl, R. (2007). Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 120, 1689–1700.
- Gao, G., Bi, X., Chen, J., Srikanta, D., and Rong, Y.S. (2009). Mre11-Rad50-Nbs complex is required to cap telomeres during *Drosophila* embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 10728–10733.
- Meyer-Ficca, M., Müller-Navia, J., and Scherthan, H. (1998). Clustering of pericentromeres initiates in step 9 of spermiogenesis of the rat (*Rattus norvegicus*) and contributes to a well defined genome architecture in the sperm nucleus. *J. Cell Sci.* 111, 1363–1370.
- Zalenskaya, I.A., and Zalensky, A.O. (2002). Telomeres in mammalian male germline cells. *Int. Rev. Cytol.* 218, 37–67.
- Linger, B.R., and Price, C.M. (2009). Conservation of telomere protein complexes: Shuffling through evolution. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 434–446.
- Karamysheva, Z.N., Surovtseva, Y.V., Vespa, L., Shakirov, E.V., and Shippen, D.E. (2004). A C-terminal Myb extension domain defines a novel family of double-strand telomeric DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 279, 47799–47807.
- Hockemeyer, D., Daniels, J.P., Takai, H., and de Lange, T. (2006). Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* 126, 63–77.
- Schmid, K.J., and Tautz, D. (1997). A screen for fast evolving genes from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9746–9750.
- Tweedie, S., Ashburner, M., Falls, K., Leyland, P., McQuilton, P., Marygold, S., Millburn, G., Osumi-Sutherland, D., Schroeder, A., Seal, R., and Zhang, H.; FlyBase Consortium. (2009). FlyBase: Enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res.* 37 (Database issue), D555–D559.
- Heatwole, V.M., and Haynes, S.R. (1996). Association of RB97D, an RRM protein required for male fertility, with a Y chromosome lampbrush loop in *Drosophila* spermatocytes. *Chromosoma* 105, 285–292.
- Liu, L., Blasco, M., Trimarchi, J., and Keefe, D. (2002). An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev. Biol.* 249, 74–84.
- Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Yau, P.M., Bradbury, E.M., and Zalensky, A.O. (2000). Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J. Cell Biol.* 151, 1591–1598.
- Greil, F., de Wit, E., Bussemaker, H.J., and van Steensel, B. (2007). HP1 controls genomic targeting of four novel heterochromatin proteins in *Drosophila*. *EMBO J.* 26, 741–751.
- Joppich, C., Scholz, S., Korge, G., and Schwendemann, A. (2009). Umbra, a chromo shadow domain protein in *Drosophila melanogaster* heterochromatin, interacts with Hip, HP1 and HOAP. *Chromosome Res.* 17, 19–36.

46. Spradling, A.C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E.J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S., and Rubin, G.M. (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* 153, 135–177.
47. Bellen, H.J., Levis, R.W., Liao, G., He, Y., Carlson, J.W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P.R., Schulze, K.L., Rubin, G.M., et al. (2004). The BDGP gene disruption project: Single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* 167, 761–781.
48. Schuh, M., Lehner, C.F., and Heidmann, S. (2007). Incorporation of *Drosophila* CID/CENP-A and CENP-C into centromeres during early embryonic anaphase. *Curr. Biol.* 17, 237–243.
49. Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3312–3317.
50. Schwartz, B.E., Werner, J.K., and Lis, J.T. (2004). Indirect immunofluorescent labeling of *Drosophila* polytene chromosomes: Visualizing protein interactions with chromatin in vivo. *Methods Enzymol.* 376, 393–404.
51. Bonnacorsi, S., Giansanti, M.G., Genci, G., and Gatti, M. (2000). Cytological analysis of spermatocyte growth and male meiosis in *Drosophila melanogaster*. In *Drosophila* Protocols, W. Sullivan, M. Ashburner, and R.S. Hawley, eds. (Woodbury, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 87–109.
52. Loppin, B., Berger, F., and Couble, P. (2001). The *Drosophila* maternal gene *sésame* is required for sperm chromatin remodeling at fertilization. *Chromosoma* 110, 430–440.
53. Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224.
54. Talavera, G., and Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* 56, 564–577.
55. Pond, S.L., and Frost, S.D. (2005). Datamonkey: Rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21, 2531–2533.
56. Yang, Z. (2007). PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1586–1591.
57. Guindon, S., Rodrigo, A.G., Dyer, K.A., and Huelsenbeck, J.P. (2004). Modeling the site-specific variation of selection patterns along lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 12957–12962.

Current Biology, Volume 20

Supplemental Information

Specialization of a *Drosophila*

Capping Protein Essential

for the Protection of Sperm Telomeres

Raphaëlle Dubruille, Guillermo A. Orsi, Lætitia Delabaere, Elisabeth Cortier, Pierre Couble, Gabriel A.B. Marais, and Benjamin Loppin

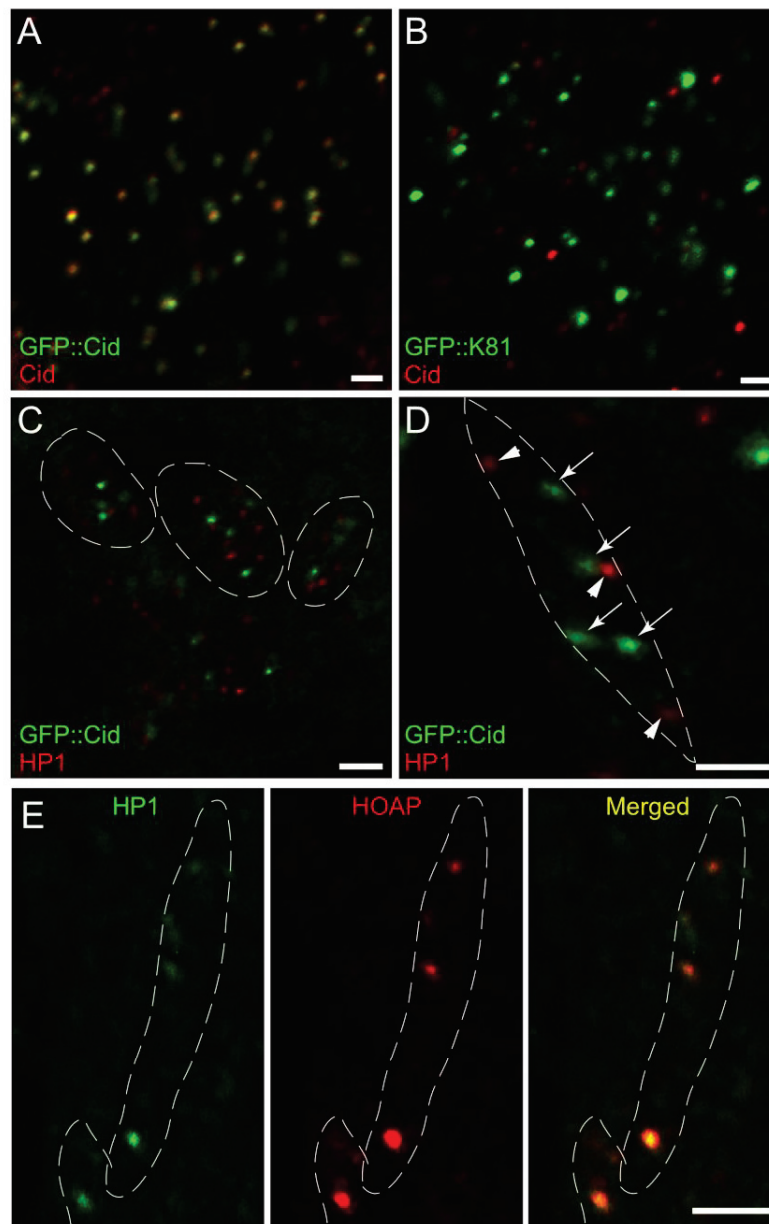


Figure S1 (Related to Figure 3). K81 and HP1 Do Not Localize at Centromeres in Spermatid Nuclei

- (A) Control testis showing the colocalization of GFP::Cid and Cid foci in spermatid nuclei.
- (B) In *5'K81-GFP::K81; K81²* adult testes, GFP::K81 accumulates in foci that are distinct from Cid foci.
- (C) In *gcid-EGFP::cid* testes, HP1 foci do not associate with GFP::Cid in round spermatid nuclei.
- (D) An elongating spermatid nucleus showing the distinct HP1 foci (arrowheads) and GFP::Cid foci (arrows).
- (E) HOAP and HP1 perfectly colocalize in elongating spermatid nuclei. Representative spermatid nuclei are outlined. Bars: 2 μ m.

```

K81      ---MSDSPHEEHRLCGLGNHTLRSPYRVIRNPHLLKFGQLINSELRS-QPLCLSCYTQLI 56
HipHop   MASIDEGSRVERRFCAVGNHTLRKPYRQLNNKYLVRFACLLNSEIRAGNLICCKCYTDLV 60
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

K81      QLYRLKNNNAKRHLANRQAASAILSRSSSEKS-HESAASVSTT-QSSEE----- 103
HipHop   RLYRKNDNAKRHKMARETAASITDVSGSQSSSHQSAPSLHVSQSSEFGASYSEGGIVT 120
          *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

K81      -----QES-----TTSAPAAAAQRAGSQLVESNS-----SDDTLFSDDYDPSS 142
HipHop   PDEELCSHRSLSDSDNVPTTSAAAIQKRQLARANLMVKPSQRLSLAQTTDCCDDYDPNS 180
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

K81      NLSLNAVNGTRLPNVQPIPKRRQFVHLNREAMAIIYLAGTTGG 184
HipHop   NLSLNAVNGTRLPHIQPIPKRRPTV-LDKQSMIDIYLMGTTGG 221
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figure S2. HipHop and K81 Protein Sequence Alignment

ClustalW sequence alignment of K81 and HipHop protein sequences from *D. melanogaster*. The overall amino-acid identity is 53%. Stars indicate conserved residues.

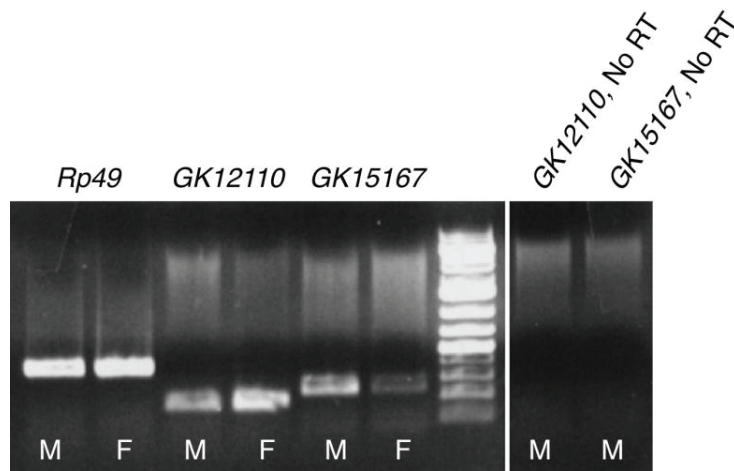


Figure S3 (Related to Figure 6). Expression Analysis of *hiphop* Paralogs in *D. willistoni*

RT-PCR on total RNA extracts from male (M) or female (F) *Drosophila willistoni* wild-type flies. *GK15167* (*hiphop* paralog) is enriched in males while *GK12110* (*hiphop*) transcripts are more abundant in female extracts. *Rp49* was amplified as a positive control. No RT controls are shown.

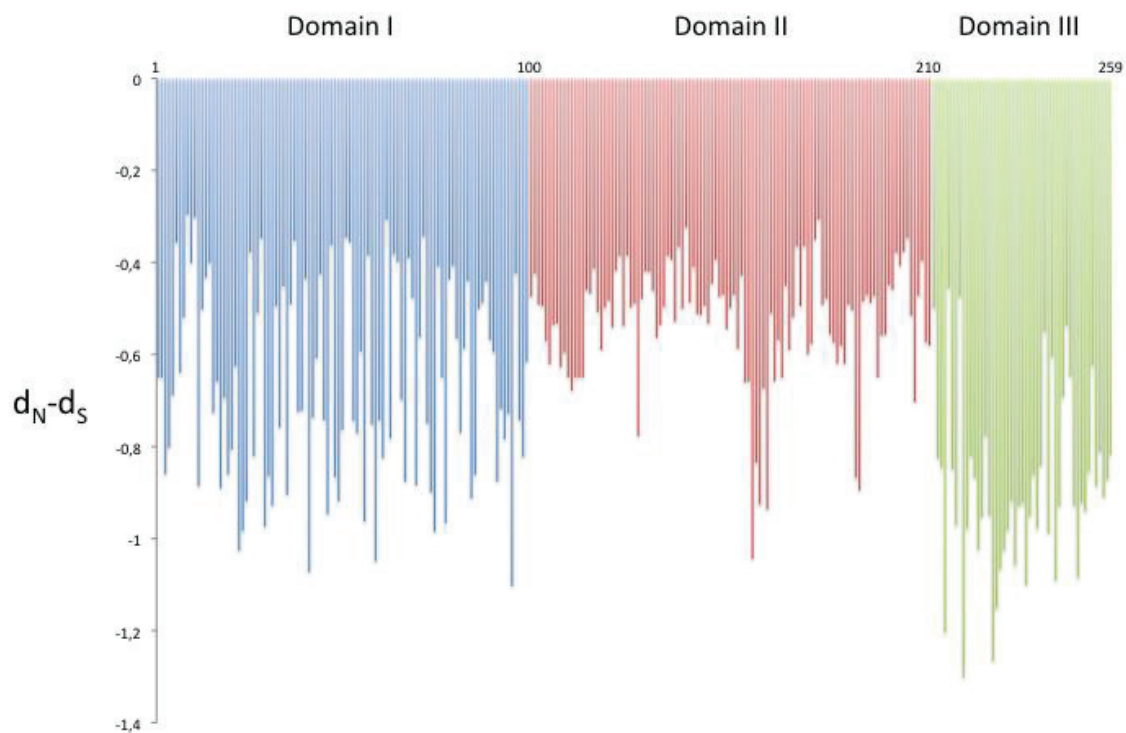


Figure S4 (Related to Figure 6). Evolutionary Rates along the *hiphop/K81* Genes

d_N-d_S was estimated from the multiple alignment of all the *hiphop/K81* genes using the site model option in the HyPhy package (see Experimental Procedures) and indicates the intensity and form of selection affecting the *hiphop/K81* genes codon by codon. All the codons were found to have a negative d_N-d_S , which means that they evolve under purifying selection (no positively selected codons could be identified). Three different domains were defined based on their d_N-d_S profiles and the alignment (presence/absence of gaps). These domains have different mean d_N-d_S with domains I and III being more constrained than domain II. Domain boundaries are shown.

Table S1 (Related to Figure 6). d_N/d_S Analysis of the *hiphop/K81* Gene Family

Lineages ^a	Global d_N/d_S ^b	Codons under relaxed selection ($d_N/d_S \sim 1$) ^c		
		Domain I ^d	Domain II	Domain III
<i>K81 melanogaster</i> subgroup (1)	0.143	43, 95, 96, 97, 100	-	250
<i>hiphop melanogaster</i> subgroup (2)	0.188	21, 22, 24, 99	121, 128	-
<i>GK15167 D.willistoni</i> (4)	0.098	3, 49	-	244
<i>hiphop D.willistoni</i> (3)	0.003	-	-	-
<i>hiphop</i> homologs in other species ^e	0.097	n.a.	n.a.	n.a.

a Numbers in brackets are those used in Figure 6 to define the lineages.

b Global d_N/d_S estimated by a branch model analysis (see Experimental Procedures).

c Codons under relaxed selection identified by a branch-site analysis (see Experimental Procedures).

d The three domains were defined after the site model analysis presented in Figure S4.

e *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. mojavensis*, *D. virilis* and *D. grimshawi*.

* The compared d_N/d_S values are significantly different (Likelihood Ratio Test (LRT), p-value < 5%; see Experimental Procedures).

n.s. not significant (p-value > 5%).

n.a. not applicable.